

**ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**Scienze Ambientali: Tutela e Gestione delle Risorse Naturali**

**Ciclo XXIV  
05/C1 - BIO/07 ECOLOGIA**

**EFFETTI DELLA SALINIZZAZIONE  
SUGLI INVERTEBRATI DEL SUOLO**

**Presentata da: Silvia Bacchi**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Enrico Dinelli**

**Relatore**

**Dott. Andrea Pasteris**

**Corelatore**

**Dott. Alessandro Buscaroli**

**Esame finale anno 2012**

*A Furia,  
che ha stravolto l'evoluzione!*

# INDICE

## 1. INTRODUZIONE

1.1. Caratteristiche ed importanza del suolo .....	6
1.2. La salinizzazione del suolo .....	10
1.3. La qualità biologica del suolo .....	17
1.4. Metodi basati sulla struttura dei popolamenti in sito.....	19
1.4.1. I microartropodi come indice di qualità biologica del suolo:	
QBS-ar e QBS-c.....	19
1.4.2. L'indice di maturità dei nematodi.....	22
1.4.3. La fauna edafica considerata: gli Arthropoda e gli Oligochaeta .....	23
1.5. Studi di campo sull'utilizzo degli invertebrati del suolo come indicatori biologici.....	41
1.6. Metodi basati su test di laboratorio.....	43
1.6.1. Ecotossicologia .....	43
1.6.2. Test ecotossicologici standardizzati.....	44
1.6.2.1. Determinazione sulla matrice liquida .....	44
1.6.2.2. Determinazione sulla matrice solida.....	45
1.7. I biomarker.....	47
1.7.1. Valutazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi.....	48
1.7.2. Stabilità delle membrane lisosomiali.....	49
1.7.3. Accumulo dei lipidi neutri insaturi nei lisosomi.....	50
1.7.4. Accumulo delle lipofuscine nei lisosomi.....	50
1.7.5. Saggio dell'attività della catalasi .....	51
1.7.6. Valutazione dell'attività del glutathione S-trasferasi.....	51
1.8. Studi di laboratorio sull'effetto della salinizzazione sugli invertebrati del suolo .....	52
2. OBIETTIVI .....	54
3. STUDIO SUI MICROARTROPODI EDAFICI DELLA PINETA DI SAN VITALE .....	56

<b>3.1. La Pineta di San Vitale</b>	<b>56</b>
3.1.1. Inquadramento geografico e origini storiche della Pineta	56
3.1.2. Inquadramento pedologico della Pineta	61
3.1.3. Studio sui microartropodi edafici	68
3.1.4. Il problema della salinizzazione nella Pineta di S. Vitale	70
<b>3.2. Materiali e metodi</b>	<b>79</b>
3.2.1. Disegno di campionamento	79
3.2.2. Campionamento ed estrazione degli invertebrati del suolo	84
3.2.3. Riconoscimento e tassonomia degli invertebrati	89
3.2.4. Calcolo delQBS-ar e del QBS-ar max	90
3.2.5. Le classi di qualità del suolo	96
3.2.6. Campionamento per le analisi chimiche	97
3.2.7. Analisi statistiche dei dati	98
3.2.7.1. I dati utilizzati	99
3.2.7.2. Misure di distanza	100
3.2.7.3. Analisi delle componenti principali (PCA)	100
3.2.7.4. Analisi delle coordinate principali (PCA)	103
3.2.7.5. Analisi multivariata della varianza per permutazioni (PERMANOVA)	103
3.2.7.6. Analisi SIMPER	106
3.2.7.7. Procedura BIOENV	107
3.2.7.8. <i>Bubble plots</i> (grafici a bolle)	108
<b>3.3. Risultati</b>	<b>109</b>
3.3.1. Caratteristiche chimiche e fisiche della falda	109
3.3.2. Caratteristiche chimiche dei suoli misurate in tutti i campioni: conduttività elettrica (CE), pH e contenuto in acqua	114
3.3.3. Caratteristiche chimiche e fisiche del suolo valutate sui campioni B.....	123
3.3.4. Composizione del popolamento, valori dell'indice QBS-ar max e classidi qualità del suolo	130
3.3.5. Analisi multivariata della struttura del popolamento	132
<b>3.4. Discussione</b>	<b>145</b>



<b>4. ESPERIMENTI DI LABORATORIO SUL LOMBRICO <i>Eisenia andrei</i></b>	
<b>4.1. Materiali e metodi.....</b>	<b>149</b>
4.1.1. Allevamento di <i>Eisenia andrei</i> .....	149
4.1.2. Procedura generale degli esperimenti .....	150
4.1.3. I biomaker utilizzati .....	152
4.1.4. Conduttività elettrica dei suoli e pH .....	153
4.1.5. Primo esperimento: effetti della sola salinizzazione.....	154
4.1.6. Secondo esperimento: effetti della sola salinizzazione.....	154
4.1.7. Terzo esperimento: effetti del solo chlorpyrifos.....	155
4.1.8. Quarto esperimento: effetti combinati di salinizzazione e chlorpyrifos.....	156
4.1.9. Conduttività elettrica e pH dei suoli .....	157
4.1.10. Analisi dei dati .....	158
<b>4.2. Risultati.....</b>	<b>159</b>
4.2.1. Primo esperimento: effetti della sola salinizzazione.....	159
4.2.2. Secondo esperimento: effetti della sola salinizzazione.....	162
4.2.3. Terzo esperimento: effetti del solo chlorpyrifos.....	164
4.2.4. Quarto esperimento: effetti combinati di salinizzazione e chlorpyrifos.....	166
4.2.5. Conduttività elettrica e pH dei suoli .....	176
<b>4.3. Discussione.....</b>	<b>180</b>
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>184</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>186</b>
<b>APPENDICE: tabelle QBS-ar max primavera ed estate .....</b>	<b>198</b>

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 Caratteristiche ed importanza del suolo**

I suoli sono corpi naturali corrispondenti allo strato superficiale della crosta terrestre, costituenti il supporto della vita vegetale e animale e pertanto una risorsa naturale fondamentale.

Si possono considerare tre fasi costituenti il suolo: solida, liquida e gassosa.

La fase solida comprende una parte organica, derivante dalla decomposizione di organismi vegetali e animali o di loro parti, ed una inorganica, formata da frammenti di roccia, granuli minerali e dai prodotti derivanti dall'alterazione degli stessi.

La fase liquida è associata all'acqua presente nel suolo più o meno da esso trattenuta. Infine, la fase gassosa è rappresentata dall'aria con i vari gas quali ossigeno, anidride carbonica e azoto (Giordano, 1999).

Secondo quanto formalizzato da Jenny (1941), alla formazione del suolo concorrono diversi fattori pedogenetici tra loro interagenti che sono: il clima, gli organismi vegetali e animali compreso l'uomo, il materiale derivante dalla roccia madre (materiale incoerente sovrastante la roccia non alterata), la morfologia e il tempo. A questi, possono aggiungersi fattori di importanza locale, quali ad esempio la saturazione idrica o la salinizzazione.

Il risultato dell'azione combinata dei fattori della pedogenesi porta alla formazione di strati di suolo aventi caratteri fisici e chimici diversi tra loro, chiamati orizzonti.

In base a quanto espresso dalla Soil Survey Division Staff (1993), un orizzonte è uno strato, più o meno parallelo alla superficie del suolo, risultante dai processi di formazione del suolo, distinguibile dagli strati adiacenti per delle proprietà caratteristiche.

Sempre secondo la Soil Survey Division Staff (1993), i principali orizzonti dei suoli sono:

- orizzonti O (organici), nei quali la componente principale risulta essere il materiale organico, come ad esempio lettiera decomposta o parzialmente decomposta;
- orizzonti A (organo-minerali), formati alla superficie e generalmente sotto un orizzonte O e caratterizzati da sostanza organica umificata frammista alla componente minerale;
- orizzonti E (eluviali), presenti vicino alla superficie, al di sotto di un orizzonte O, questi orizzonti hanno subito la perdita di sostanze in soluzione o sospensione e ne risultano perciò impoveriti;
- orizzonti B (illuviali), formati sotto agli orizzonti A, E o O e caratterizzati dall'accumulo di sostanze provenienti dagli orizzonti superiori;
- orizzonti C, riconducibili principalmente a strati minerali, incoerenti, nulla o poco influenzati dai processi che coinvolgono gli orizzonti O, A, E o B e perciò mancanti delle proprietà degli stessi;
- orizzonti R, costituenti la roccia madre inalterata e coerente;
- orizzonti di transizione, che si trovano tra due differenti orizzonti quando quest'ultimi non hanno una separazione netta, o le proprietà dell'orizzonte sovrastante e di quello sottostante sono sovrapposte, oppure parti di un orizzonte sono incluse in un altro.

Il suolo è una risorsa non rinnovabile, che soddisfa molte funzioni vitali di importanza socio-economica ed ambientale. Il suolo ha un ruolo come habitat e pool

genetico; funge da basamento per le attività antropiche, il paesaggio e il patrimonio storico e fornisce molte materie prime.

Pertanto, il suolo è sottoposto a molte pressioni essendo alla base di una gamma di beni e servizi essenziali che garantiscono e regolano la vita sul pianeta (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Questo complesso sistema biogeochimico è non solo un mezzo di supporto per la produzione agricola e forestale, ma soprattutto un componente critico di un insieme diversificato di eco-processi relativi al ciclo dell'acqua, ai flussi di carbonio organico, alla produzione e immagazzinamento di gas ad effetto serra, al ciclo dei nutrienti.

Così, come riportato dal *“The European Environment State and Outlook 2010”* (Jones A. *et al.*, 2010) in riferimento al comparto suolo, il nostro benessere e la nostra economia dipendono da un moltitudine di funzioni riconducibili al suolo:

- il suolo è il mezzo che ci permette di produrre il cibo, per noi esseri umani e per gli animali, le fibre naturali, il legname e sostiene la fauna selvatica. Circa il 99% della fornitura globale di cibo per il consumo umano proviene dalla produzione basata sull'agricoltura (FAO, 2007);
- il suolo è un filtro naturale che neutralizza alcuni inquinanti trasformandoli o accumulando e assorbendo la loro tossicità. Inoltre, i suoli sono un fattore importante nella purificazione dell'acqua ed una componente fondamentale per la regolazione delle inondazioni attraverso l'accumulo dell'acqua piovana.

L'impermeabilizzazione e la compattazione dei suoli comportano un più rapido afflusso di acqua piovana alla rete fluviale;

- il suolo è un reattore biologico dove spoglie vegetali e animali e altri scarti organici sono decomposti per fornire nutrienti che sostengono la vita, tramite processi di decomposizione guidati da una grande quantità di microrganismi come batteri, funghi, protozoi, nematodi, insetti, ragni, vermi, e apparati radicali.

Questo biota è coinvolto nella maggior parte delle funzioni più importanti del suolo: guida i processi fondamentali del ciclo dei nutrienti, regola le comunità vegetali, influenza la degradazione delle sostanze inquinanti e contribuisce alla stabilizzazione della struttura del suolo. Gli organismi del suolo rappresentano anche una fondamentale risorsa biotecnologica, ad esempio, molte specie di batteri e attinomiceti possono essere fonti di antibiotici e altri farmaci;

- il suolo svolge un ruolo cruciale nel regolare una serie di cicli biologici e chimici a sostegno della vita naturale (azione ecosistemica). Carbonio, azoto e altri nutrienti essenziali vengono continuamente riciclati nel ciclo che coinvolge il suolo, le piante, i depositi geologici, l'acqua e l'atmosfera. L'intensità di questi scambi biogeochimici varia da luogo a luogo ed è regolata dalle specifiche caratteristiche ambientali del suolo;
- il suolo costituisce la base su cui costruire gli edifici, le strade e altre infrastrutture.

Oltre a fornire il supporto fisico per la maggior parte delle infrastrutture umane, il suolo fornisce anche una gamma di materie prime come argilla per la ceramica e torba per la produzione di combustibile;

- il suolo conserva il patrimonio storico e archeologico sepolto, preservandolo da danni e impoverimento. Il grado di conservazione dipende dalle caratteristiche del suolo e dalle condizioni locali.

## 1.2 La salinizzazione del suolo

I sali sono sostanze naturalmente presente nei suoli e nell'acqua. I suoli che presentano un problema di salinizzazione sono caratterizzati da una presenza eccessiva di sali (o ioni derivanti da questi) che possono provocare la formazione di suoli salini o suoli sodici.

I suoli salini derivano dall'accumulo di sali, comunemente rappresentati da cloruri, solfati, carbonati e bicarbonati di sodio, potassio, magnesio, calcio, che determinano un aumento eccessivo degli ioni, ad essi associati, nella soluzione circolante presente all'interno del suolo (SoCo Project Team, 2009).

Secondo il World Reference Base for Soil Resources (FAO, ISRIC e ISSS, 1998), i suoli salini sono classificati come *Solonchaks* e la loro identificazione avviene in base alla presenza dell'orizzonte "salico", un orizzonte superficiale o sub-superficiale arricchito in sali solubili.

La valutazione della salinità del suolo viene effettuata sulla base della misura della conduttività elettrica (CE) dell'estratto in pasta satura, o di sospensioni suolo-acqua in diverso rapporto (1:2,5 o 1:5). Esiste infatti una stretta relazione tra contenuto salino e capacità del mezzo di trasmettere elettricità. Viene definito salino un suolo che presenti CE in pasta satura  $> 4$  dS/m a 25°C (USDA, 1954).

Più in dettaglio, è possibile procedere ad una ulteriore suddivisione dei livelli di salinità, anche in relazione alla diversa modalità di determinazione analitica, come mostrato in Tab. 1.1 (Sbaraglia & Lucci, 1994; RER, 1994).

Tab. 1.1. Classi di salinità del suolo (individuare da Sbaraglia e Lucci, 1994 e RER, 1994).

CE pasta satura (dS/m)	CE (1:2,5) (dS/m)	Valutazione
0-2	0-0.5	Non salino
2-4	0,6-1	Leggermente salino
4-8	1,1-2	Moderatamente salino
8-16	2,1-4	Molto salino
>16	>4	Estremamente salino

I suoli sodici invece, sono caratterizzati da una elevata concentrazione di ioni sodio ( $\text{Na}^+$ ) nelle fasi solida o liquida. Il sodio può cristallizzare formando le “efflorescenze” di carbonato acido di sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) o carbonato di sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a livello della superficie del suolo o della superficie degli elementi strutturali presenti al suo interno, oppure può rimanere in soluzione in forma ionica comportando l’alcalinizzazione del suolo, o ancora può essere adsorbito, sempre in forma ionica, a livello di argille e/o carbonati divenendo parte del complesso di scambio cationico (CSC) (SoCo Project Team, 2009).

In base al WRB (FAO, ISRIC e ISSS, 1998), i suoli che presentano caratteri alcalini sono definiti *Solonetz*. Per essere definiti in tal modo devono presentare un orizzonte detto “sodico” nei primi 100 cm dalla superficie del suolo. L’orizzonte “sodico” è un orizzonte sub-superficiale che presenta un’elevata densità, alto contenuto in argilla (maggiore rispetto agli orizzonti superiori) e una elevata concentrazione di ioni sodio e/o magnesio.

I suoli *Solonetz* e anche i suoli che presentano delle proprietà “sodiche”, sono caratterizzati da una elevata alcalinità. Vi sono poi i suoli “Iposodici” che presentano un’alcalinità media. Le caratteristiche dei suoli *Solonetz* possono essere usate anche

per caratterizzare la presenza di un orizzonte con proprietà “sodiche”, per il quale si individuano tre differenti classi di alcalinità:

- bassa,  $ESP < 6 \%$
- media,  $6 < ESP < 15 \%$
- alta,  $ESP > 15 \%$

(ESP, Exchangeable Sodium Percentage, è la percentuale di sodio scambiabile adsorbita al complesso di scambio).

Per i suoli salini si possono distinguere due forme di salinizzazione: primaria e secondaria.

La salinizzazione primaria riguarda un accumulo di sali nel suolo dovuto a processi naturali quali: rilascio di elevate concentrazioni di sali dal materiale parentale all'acqua di falda e quindi al suolo in seguito a movimenti di trasgressione o regressione in particolari condizioni geologiche, risalita di acqua arricchita in sali dalla falda verso la superficie o verso gli orizzonti superficiali in particolari situazioni (ad esempio elevata evapotraspirazione estiva), intrusione salina nella falda in regioni a quote inferiori al livello marino, microdepressioni caratterizzate dall'assenza o da scarso drenaggio, inondazioni di acque ricche in sali provenienti da aree caratterizzate da substrati geologici che rilasciano elevate concentrazioni di sali, azione dell'aerosol marino con deposito di sali sulla superficie del suolo nelle regioni costiere (Várallyay, 2006).

La salinizzazione secondaria è dovuta invece all'azione antropica che si può spiegare in: irrigazione con acqua ricca in sali, innalzamento del livello piezometrico (per filtrazione da canali non confinati, irrigazione scarsa o irregolare, scarso drenaggio), uso di fertilizzanti e/o ammendanti soprattutto in zone destinate ad una attività agricola di tipo intensivo, pianeggianti, con scarsa permeabilità e filtrazione, contaminazione del suolo con acque ricche in sali e in prodotti derivanti da processi industriali (Várallyay, 2006).

Le conseguenze negative associate al problema della salinizzazione sono molteplici e riferibili principalmente alla biosfera e alla pedosfera. Il principale effetto associato ad un aumento della salinità è l'incremento del potenziale osmotico dell'acqua contenuta nel suolo che provoca stress idrico per le piante, che non riescono più ad assorbire l'acqua dal suolo.



Inoltre, la salinizzazione aumenta l'impermeabilità degli strati profondi del suolo, impedendone, di fatto, l'uso per la coltivazione (Van-Camp *et al.*, 2004).

Per il caso specifico del sodio, oltre a determinare lo sbilanciamento del rapporto tra ioni mono e polivalenti, è compromessa la struttura del suolo. In alcuni casi si ha la totale e irreversibile destrutturazione del suolo che non può più ospitare specie vegetali per fini agricoli o appartenenti alla vegetazione naturale potenzialmente presente, comportando anche un'alterazione dello specifico sistema idrologico.

Anche la composizione specifica dei sali può avere degli effetti significativi sulla salute delle piante: una composizione sbilanciata può determinare degli effetti tossici o inibire l'assorbimento di nutrienti o elementi essenziali. Inoltre, gli ioni derivanti dai sali possono comportare una variazione della reazione del suolo (pH) con conseguenti cambiamenti del chimismo degli ioni in soluzione e dunque possibili effetti tossici per le piante o deficit di nutrienti (Bloem *et al.*, 2008).

I suoli alcalini, non permettendo la crescita delle piante a causa del pH elevato, hanno la caratteristica di essere facilmente erodibili dall'acqua e dal vento (Van-Camp *et al.*, 2004).

Tali conseguenze hanno a loro volta delle ripercussioni a più ampia scala a livello di: biodiversità, causando la compromissione della vita e delle funzioni delle biocenosi presenti nel suolo; funzioni specifiche del suolo (aumento del potenziale di erosione e desertificazione, riduzione della struttura del suolo, distruzione degli aggregati, compattazione); ciclo idrologico (variazioni sul regime di umidità del suolo, aumento del pericolo, della frequenza, della durata e dell'intensità di fenomeni estremi quali ad esempio allagamenti o viceversa situazioni di siccità); ciclo biogeochimico in relazione ad alterazioni dei composti assorbiti dalle piante come nutrimento, possibili effetti sinergici con inquinanti presenti nel suolo e potenziale formazione di composti o singoli elementi pericolosi (Huber *et al.*, 2008).

I tipi di suolo colpiti dal problema della salinizzazione si differenziano sia per le caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche, sia nella loro distribuzione geografica.

Secondo quanto espresso nel Report del progetto “*Sustainable Agriculture and Soil Conservation*” (SoCo Project Team, 2009), i principali fattori naturali che influenzano la salinità del suolo sono: il clima, il materiale parentale, la copertura vegetale e/o i singoli tipi di vegetazione, la morfologia e le specifiche caratteristiche del suolo.

A livello antropico, i più importanti fattori influenti sono: il tipo di utilizzo del suolo, il tipo di gestione del territorio e il livello di degrado del territorio. Dal punto di vista geografico, il problema della salinizzazione del suolo riguarda ampie zone di tutti i continenti della Terra. Salinizzazione, alcalinizzazione e sodicizzazione sono, a livello mondiale, tra i più importanti e più diffusi processi di degradazione del suolo, nonché tra i principali agenti di stress ambientali ed ecologici della biosfera. Rappresentano dunque un limite al potenziale agro-ecologico del suolo ed un rischio ecologico e socio-economico per lo sviluppo sostenibile (Jones *et al.*, 2010). In particolare, si stima che tale problema sia la maggiore causa di desertificazione dei suoli (Van-Camp *et al.*, 2004).

Secondo recenti stime, a livello globale, la superficie affetta da tali fenomeni si aggira intorno ad un miliardo di ettari. Le zone più colpite sono le regioni aride e semiaride dell'Asia, Australia e Sud America (Huber *et al.*, 2008). Come si può osservare nella Fig. 1.1, in Europa il problema della salinizzazione colpisce una superficie pari a circa 3.8 milioni di ettari (EEA, 1995) e riguarda sia territori caratterizzati naturalmente da suoli salini come Spagna, Ungheria, Grecia e Bulgaria, sia territori salinizzati attraverso l'azione antropica. Tra questi troviamo alcune zone in Italia, Portogallo, Francia e Slovacchia e la Valle dell'Ebro in Spagna (Jones *et al.*, 2010). In generale comunque, le regioni più colpite sono quelle affacciate sul Mediterraneo (Van-Camp *et al.*, 2004). Considerando poi gli attuali cambiamenti climatici, con l'aumento della temperatura e la riduzione delle precipitazioni, si sta osservando un peggioramento della situazione (Van-Camp *et al.*, 2004) e il trend futuro si prospetta in aumento per molti stati come ad esempio Spagna, Grecia, e Ungheria (De Paz *et al.*, 2004), sebbene non si abbiano dati sistematici per tutta l'Europa (Jones *et al.*, 2010).

Per il nostro paese ancora oggi non è disponibile, a livello nazionale, una cartografia di dettaglio che dia conto di caratteristiche e distribuzione dei suoli salini. Una indagine conoscitiva ha evidenziato che le aree maggiormente affette dal problema risultano essere la bassa pianura padano-veneta, le aree costiere tirreniche ed adriatiche e le isole (Fig. 1.2). Si noti la diffusione del fenomeno in Sicilia dove i suoli interessati da salinizzazione coprono circa il 10% del territorio regionale pari circa a 250.000 ha (Fierotti *et al.*, 1999).

## Saline and Sodic Soils in European Union

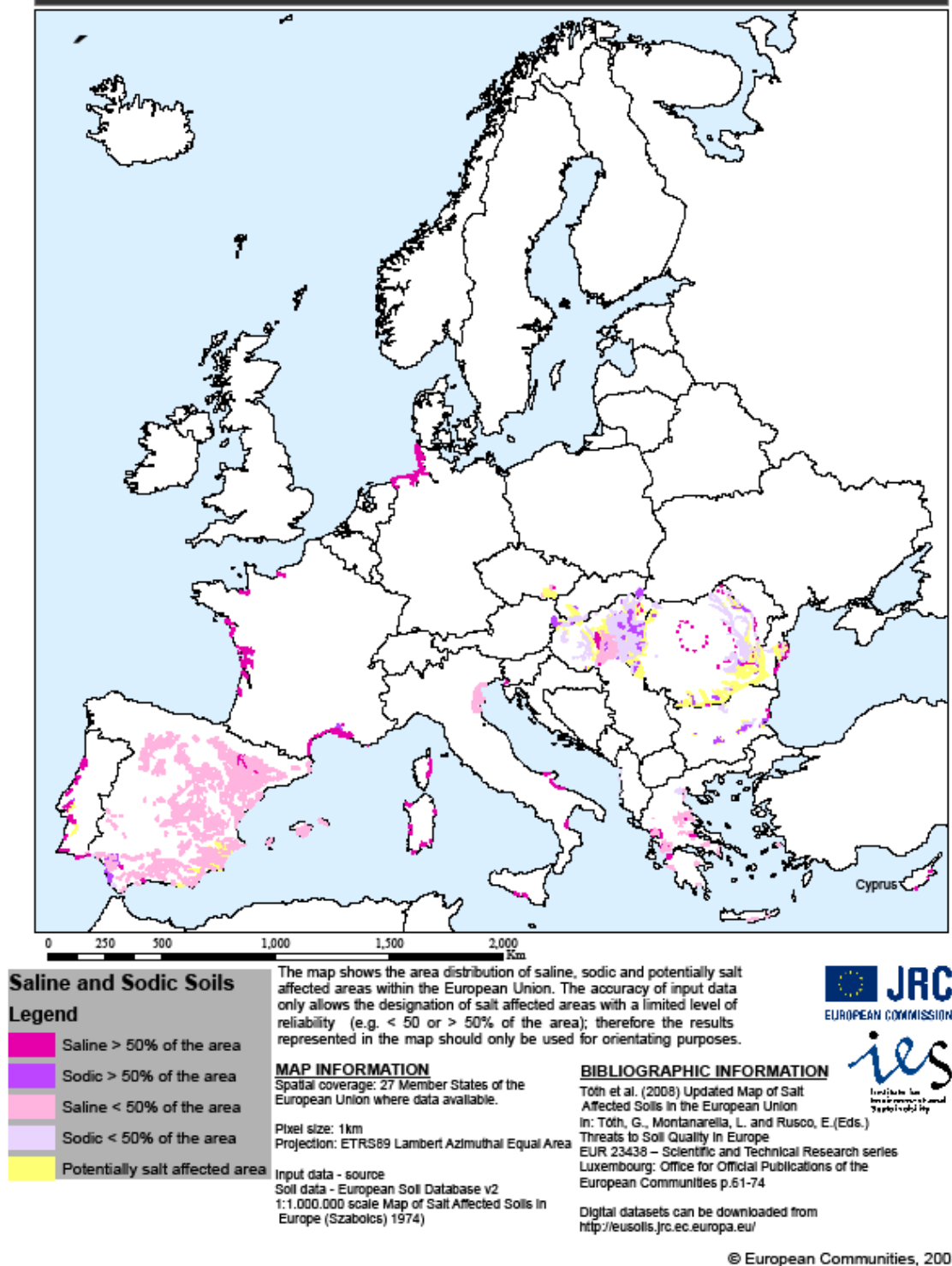


Fig.1.1 Carta della distribuzione dei suoli salini e dei suoli sodici nell'Unione Europea (da Tóth et al., 2008).



*Fig.1.2 Carta della distribuzione dei suoli salini e dei suoli sodici in Italia (da Fierotti et al., 1999).*

### **1.3 Qualità biologica del suolo**

Il monitoraggio biologico del suolo, definito anche biomonitoraggio, è rivolto alla valutazione della qualità del suolo attraverso l'uso di organismi viventi.

Rispetto ad altre matrici (aria, acqua), la ricerca e l'applicazione di strumenti biologici per identificare la qualità biologica del suolo mostrano ancora un notevole ritardo, imputabile soprattutto alle carenze conoscitive sugli ecosistemi edafici e sui loro singoli componenti.

L'idea di base della bioindicazione è che la relazione tra fattori e comunità del suolo può essere stretta: quando i fattori del suolo influenzano la struttura di comunità, la struttura di comunità può contenere informazioni relative alle caratteristiche del suolo.

La bioindicazione può essere definita come la lettura di un cambiamento della struttura o della funzione dei processi biochimici o cellulari, indotto da un contaminante o da un'alterazione del sistema e può essere quantificata.

Informazioni relative alla qualità ambientale e alle variazioni che avvengono in un ecosistema possono essere ottenute da diversi livelli di organizzazione biologica.

I biomarker, per esempio, consentono la misura di variabili biochimiche e fisiologiche negli individui e nei loro prodotti di escrezione; i bioindicatori, organismi con specifiche richieste ecologiche, forniscono indicazioni relative ai cambiamenti ambientali; le comunità, che rappresentano i livelli di complessità più elevata, consentono di ottenere informazioni riguardanti l'intera zoocenosi e le relazioni che la caratterizzano; gli indici, complesso di più indicatori, permettono di avere informazioni sintetiche da più parametri, fornendo però un grado di specificità e risoluzione minore.

A differenza degli organismi bioindicatori, che quindi sono in grado di fornire indicazioni relative ad un cambiamento all'interno di un ecosistema, gli organismi bioaccumulatori sono organismi che assimilano dal suolo, dall'acqua o dall'atmosfera quantità misurabili di elementi chimici e/o di composti xenobiotici.

L'individuazione di un organismo come bioindicatore è un'operazione complessa, che generalmente richiede conoscenze dettagliate relative alla tassonomia e all'ecologia delle specie individuata come potenzialmente indicatrice.

Per lo studio della comunità di viventi del suolo, attualmente sono disponibili un numero limitato di indicatori ed indici i cui protocolli e procedure siano standardizzati e accettati a livello internazionale. Inoltre, nella maggior parte dei casi, non sono ancora disponibili valori di riferimento di suoli definiti di buona qualità, e tali valori possono variare significativamente in relazione alla tipologia di suolo, all'uso al periodo culturale, ecc.. Per questi motivi si rendono necessari ulteriori studi condotti su indicatori a differenti livelli di organizzazione biologica e in situazioni ambientali anche molto diverse. E' importante considerare che studi e indicazioni di tipo biologico non possono essere isolate dagli altri due elementi di valutazione dello stato di salute di un suolo: analisi chimiche e fisiche.

Un esempio di integrazione di differenti aspetti abiotici e biotici nella valutazione della qualità del suolo viene proposto da Rutgers e colleghi (2000). Gli studiosi hanno proposto l'integrazione di analisi chimiche, prove biologiche e, per quanto riguarda le prove ecologiche, l'indice di comunità di nematodi associato alla classificazione ecologica dei lombrichi e alla ricchezza in specie di microartropodi, secondo lo schema *Soil Quality Diamond* simile all'approccio *Triad* già applicato da lungo tempo nella valutazione dei sedimenti.

## **1.4 Metodi basati sulla struttura dei popolamenti in sito**

### **1.4.1 I microartropodi come indice di qualità biologica del suolo: QBS-ar e QBs-c**

La moltitudine di animali che abita nel suolo (pedofauna) svolge un ruolo fondamentale nella vita e nello sviluppo dello stesso. Ogni individuo, a seconda del tipo di attività, interagisce in maniera differente con l'ecosistema contribuendo alla formazione ed evoluzione del suolo ed alla trasformazione dei nutrienti.

batteri, acari oribatidi, anellidi enchitreidi e lombrichi, coleotteri e altri artropodi saprofagi svolgono un ruolo fondamentale nella decomposizione e trasformazione della sostanza organica, nel riciclo delle sostanze nutritive, come azoto e fosforo, e nel rimescolamento del suolo.

I predatori, come acari, pseudoscorpioni, araneidi, alcuni coleotteri e formicidi, contribuiscono a regolare il numero di individui delle altre popolazioni di invertebrati.

Come tutti gli animali, anche quelli che vivono nel suolo risentono dei cambiamenti ambientali.

Le modificazioni delle componenti chimico-fisiche e biologiche del suolo, della sua areazione e idratazione e l'immissione di sostanze inquinanti, possono provocare profonde modificazioni nella struttura dei popolamenti. Per questo motivo, gli invertebrati del suolo sono degli ottimi indicatori della qualità dell'ambiente in cui vivono e sempre per questo motivo bisogna porre molta attenzione nella gestione e utilizzo di questo complesso ecosistema.

Dunque le zoocenosi del suolo possono essere considerate importanti descrittori della qualità dell'ambiente. In base ad una classificazione sulla taglia, si possono distinguere quattro categorie: microfauna (animali di taglia inferiore agli 0,2 mm) a cui appartengono principalmente protozoi, batteri, nematodi, rotiferi e tardigradi; mesofauna (animali di taglia compresa tra gli 0,2 mm ed i 5 mm) a cui appartengono acari, collemboli, larve di ditteri e di coleotteri, pseudoscorpioni, proturi, dipluri, isopodi, nematodi, anellidi enchitreidi, ecc.; macrofauna (animali di taglia compresa

tra i 5 mm e gli 80 mm) come anellidi lombricidi, gasteropodi, opilioni, araneidi, larve di insetti, formicidi, coleotteri, e molti altri; megafauna (animali di taglia superiore gli 80 mm) rappresentati per lo più da vertebrati come anfibi, rettili, mammiferi insettivori e roditori.

Attualmente non esiste una norma che regoli lo svolgimento delle prove per l'applicazione degli indici biologici di qualità del suolo, quindi le metodologie da utilizzare sono derivate da quanto presente in letteratura e dall'esperienza.

Recentemente, è stata proposta l'applicazione di indici sintetici per la valutazione della qualità biologica del suolo basata sulle caratteristiche dei popolamenti di microartropodi presenti appartenenti alla mesofauna e macrofauna (Parisi, 2001).

Tali indici QBS-ar e QBS-c si basano sull'applicazione del criterio delle *forme biologiche* (Sacchi e Testard, 1971) dei microartropodi edafici, con il duplice intento di dare una valutazione del livello di adattamento alla vita ipogea (Parisi, 1974) e di superare, sotto il profilo operativo, le ben note difficoltà dell'analisi tassonomica a livello di specie.

Per fare ciò, gli esemplari vanno ripartiti in gruppi omogenei, quanto più possibile, dal punto di vista morfologico.

I principali caratteri morfologici di adattamento alla vita ipogea nei microartropodi sono i seguenti:

- miniaturizzazione del corpo o comunque forte riduzione della sua sezione trasversale;
- riduzione della pigmentazione anche attraverso la semplificazione della livrea, fino all'assunzione di una pigmentazione di camuffamento o alla completa depigmentazione;
- riduzione della lunghezza delle appendici, fino alla loro degenerazione o sparizione;
- nel caso degli insetti, nelle specie appartenenti a gruppi primitivamente alati, atrofia o sparizione delle ali (o delle due paia o di quello metatoracico);
- riduzione degli apparati visivi fino all'anoftalmia;



- semplificazione delle fanere con loro eventuale specializzazione;
- presenza di strutture esterne apomorfiche di adattamento alla vita ipogea come ad esempio l'organo postantennale (PAO) nei collemboli.

Entrambi gli indici hanno come obiettivo primario quello di misurare l'entità della convergenza morfologica alla vita ipogea dei microartropodi in differenti ambienti e, come ricaduta applicativa, quella di fornire un valore numerico risultante quale indice sintetico di qualità biologica del suolo.

Nel QBS-ar ad ogni gruppo di microartropodi viene associato un valore numerico definito EMI (Indice Ecomorfologico); il valore di EMI, compreso tra 1 e 20, è tanto maggiore quanto più è elevato il numero di caratteri morfologici di adattamento al suolo (EMI; Parisi, 2001; Parisi *et al*, 2005).

Nel QBS-c invece vengono considerati solamente i collemboli.

Una volta ottenuto il campione di microartropodi si raggruppano tutti gli esemplari di collemboli presenti nella selettura in relazione alla loro somiglianza morfologica.

All'interno di ogni gruppo di somiglianza si cerca preliminarmente di riconoscere le famiglie e i generi con EMI differenti. Si procede alla stesura dell'elenco degli EMI differenti trovati. La somma degli EMI rappresenta il QBS-c del campione.

Il QBS-c, anche se di più complessa applicazione, si è dimostrato particolarmente utile nel discriminare parcelle di suolo con caratteristiche diverse per quanto riguarda acqua, sostanza organica e trattamenti meccanici. Applicando infatti questo indice ad alcuni casi di studio, si è potuto mettere in evidenza la capacità di questo indice a discriminare tra le diverse situazioni, completando in modo adeguato le indagini. Così nel caso esaminato da Migliorini e colleghi (2003) il QBS-c di un prato ripariale è risultato di 90, mentre un bosco ha dato il valore di 222; nel caso di studio di Gardi e colleghi (2002) il suolo sottoposto a periodiche sommersioni ha dato un valore di QBS-c più alto.

### 1.4.2 L'indice di maturità dei nematodi

Le comunità di nematodi si prestano particolarmente bene alla valutazione della qualità ambientale per l'ecosistema terrestre ma anche per quello marino e dei corsi d'acqua dolce. Infatti, hanno una grande diversità intraspecifica formando vari gruppi eterogenei, sia dal punto di vista trofico, sia in termini di cicli riproduttivi e areali di distribuzione (Bongers, 1990). Tra gli indici relativi a questo gruppo il Maturity Index (MI, Bonges, 1990) è quello maggiormente applicato.

E' un indice nematologico non troppo difficile da usare, perché non richiede il riconoscimento delle specie o dei generi, ma solo delle famiglie. Ad ogni famiglia è stato assegnato un valore ecologico che va da 1 (famiglie tipiche di suoli o sedimenti inquinati) a 5 (famiglie tipiche di suoli o sedimenti intatti). I valori bassi (1 e 2) appartengono a nematodi colonizzatori (c), cioè opportunisti e capaci di invadere rapidamente habitat instabili, temporanei o inquinati. I valori alti (4 e 5) appartengono a nematodi persistenti (p), cioè a ciclo biologico lento e tipici di habitat stabili e non soggetti a stress o a eventi inquinanti. Pertanto la scala del Maturity Index viene espressa come gradiente di valori c-p. La classificazione dei nematodi è così definita:

- c-p 1 *enrichment opportunists* (indicatori di inquinamento organico); organismi con generazioni brevi (pochi giorni), che producono numerose uova e crescono a ritmo esponenziale in condizioni di abbondanza di nutrimento. Tollerano relativamente bene lo stress da inquinanti e sono in grado di entrare in criptobiosi o diapausa.
- c-p 2 *general opportunists* (indicatori di altro tipo di inquinamento o di stress); organismi con brevi tempi di generazione ma non in grado di entrare in criptobiosi o diapausa.
- c-p 3 *persisters* organismi con tempi di generazione più lunghi e relativa sensibilità agli inquinanti;

- c-p 4 *persisters* organismi caratterizzati da lunghi cicli vitali, cuticola permeabile e discreta sensibilità agli inquinanti;
- c-p 5 *persisters* (indicatori di buona qualità del suolo), organismi con cicli vitali più lunghi e tasso riproduttivo più basso, produzione di poche uova, capacità di spostamento limitata e molto sensibili agli inquinanti e ai fenomeni di disturbo.

Il Maturity Index è calcolato come la media pesata dei valori c-p individuali.

Il valore dell'indice vicino ad 1 esprime una predominanza di individui colonizzatori e indicatori di un ambiente poco stabile; valore dell'indice compreso tra 2 e 4 esprime una maggiore abbondanza di persistenti ed è indice di un sistema tendenzialmente più stabile.

### **1.4.3 La fauna edafica considerata: gli Arthropoda e gli Oligochaeta**

In base a quanto riportato dal manuale per l'applicazione dell'Indice QBS-ar (Codurri *et al.*, 2005), gli Arthropoda costituiscono il phylum con il più elevato numero di specie (1 milione) e sono presenti in tutti gli ambienti, riuscendo a sopravvivere da 10000 m di profondità nel mare, sino a 6000 m di quota in montagna. Le caratteristiche principali che li caratterizzano sono: corpo diviso in segmenti (o sezioni), appendici articolate, simmetria bilaterale, presenza di un esoscheletro chitinoso (cuticola), sessi quasi sempre separati, generalmente presenza di stadi larvali con caratteristiche anatomiche molto diverse dagli adulti.

Gli Arthropoda sono suddivisi in due subphyla: chelicerati e mandibolati.

I chelicerati sono caratterizzati dall'avere il corpo diviso in due parti. Quella anteriore, dove capo e torace sono fusi in una unica struttura chiamata cefalotorace (prosoma) ed una posteriore chiamata addome (opistoma).

Il cefalotorace comprende sei paia di appendici articolate: le prime due paia comprendono i cheliceri con funzione in genere alimentare, i pedipalpi con funzioni

alimentari e sensoriali e le altre quattro paia costituiscono le zampe con funzioni ambulatorie.

Nella parte posteriore, l'addome, accoglie la maggior parte dei visceri.

Questo subphylum comprende numerose classi ed ordini.

La classe Arachnida comprende numerosi ordini, tra questi, quelli che hanno un'importanza rilevante associata al suolo sono: acari (che probabilmente costituiscono un ordine polifiletico), araneidi, opilioni, palpigradi e pseudoscorpioni (Menta, 2008).

Nello specifico, l'ordine degli acari è quello che assume particolare significato sia per l'elevato numero di specie appartenenti (50000 specie descritte, corrispondenti probabilmente solo al 5% di quelle esistenti) sia per l'enorme capacità di radiazione adattativa, che ha fatto sì di ritrovarli un po' in tutti gli ambienti, compresi quelli estremi.

In generale, gli acari sono organismi di piccole o piccolissime dimensioni (acari deriva infatti dal greco *akari* che significa molto piccolo), comprese in media tra 0.2 mm e 3 cm, aventi una morfologia molto diversa rispetto agli altri ordini appartenenti alla classe Arachnida. Il corpo è ovale, privo di un'evidente segmentazione in quanto il cefalotorace e l'addome sono fusi assieme. Nonostante questo, si distinguono una regione anteriore, chiamata gnatosoma, che presenta i cheliceri e i pedipalpi, ed una regione posteriore, l'idiosoma, che reca nell'adulto quattro paia di zampe ambulatorie. Presentano uno sviluppo indiretto: dall'uovo nasce una larva con solo sei zampe che, attraverso vari stadi ninfali arriverà poi ad essere un adulto con otto zampe. Avendo varie modalità di alimentazione, gli acari presentano adattamenti funzionali nella forma dello gnatosoma, dei cheliceri e dei pedipalpi, mostrando un elevato polimorfismo (Fig. 1.3).



*Fig. 1.3 Varie morfologie di acari (da <http://it.wikipedia.org>).*

Alcuni gruppi con cheliceri a stiletto si nutrono dei succhi delle cellule vegetali, altri di sangue, ci sono gruppi predatori di artropodi o nematodi con pedipalpi molto sviluppati, gruppi detritivori.

Gli acari che vivono nel suolo sono spesso ricoperti da setole per trattenere un sottile velo d'aria in caso di allagamento degli interstizi in cui vivono.

Essi rappresentano il raggruppamento sistematico più numeroso tra gli Arthropoda del suolo e si ripartiscono in 4 Sottordini: Astigmata, Mesostigmata, Oribatida e Prostigmata.

Gli Oribatida sono uno dei gruppi più abbondanti di individui negli strati ricchi di sostanza organica in decomposizione. Hanno forma globosa con esoscheletro sclerificato e spesso di colore scuro. Si cibano di detriti vegetali, funghi, escrementi, preferendo quelli con basso rapporto tra carbonio e azoto (C/N). Compiono spostamenti verticali sia giornalieri che stagionali in base alla temperatura, all'umidità ed al contenuto di humus; diventano più rari nei suoli sottoposti a lavorazioni agricole.

Gli araneidi sono i comuni ragni. Hanno il cefalotorace e l'addome non segmentati ma uniti da un sottile peduncolo. I cheliceri sono piccoli e dotati di ghiandole del

veleno. I pedipalpi sono corti, costituiti da sei articoli. L'articolo basale presenta un ingrossamento che serve per spremere e masticare la preda. Le zampe sono quattro e sono formate da sette articoli. Nell'addome si trovano delle appendici chiamate filiere da cui esce la seta che serve per costruire la tela, per avvolgere la preda, come rifugio per le mute, per l'ibernazione, o per il trasporto delle uova. Sono predatori generici di altri invertebrati che, una volta catturati, digeriscono enzimaticamente all'esterno del corpo per poi ingerire il liquido attraverso un esofago e uno stomaco succhiatore. Il maschio è più piccolo della femmina (Fig. 1.4).



*Fig. 1.4 Fotografia allo stereomicroscopio di un araneide (foto di Bacchi S.).*

Gli pseudoscorpioni hanno grandi pedipalpi chelati di 6 articoli che conferiscono loro un aspetto simile agli scorpioni ma, a differenza di questi, non hanno il lungo addome terminante con l'aculeo velenifero. Il cefalotorace non è segmentato mentre l'addome, sessile, presenta 11 segmenti.

Producono una seta che serve per costruire nidi destinati alle mute e allo svernamento. Sono predatori di insetti che catturano con le ghiandole velenifere delle chele. Oltre che nel suolo si rinvencono nel muschio, sulle cortecce, sotto i sassi, nelle grotte e anche nelle case. Nel suolo sono presenti in bassa densità (Fig. 1.5).



*Fig. 1.5 Fotografia allo stereomicroscopio di uno pseudoscorpione (foto di Bacchi S.).*

Il subphylum dei mandibolati è contraddistinto dall'avere il corpo diviso in capo e tronco di molti segmenti, oppure in capo, torace e addome, in quelli più evoluti. Le appendici sono formate da una o due paia di antenne, un paio di mandibole, una o più paia di mascelle, tre o più paia di zampe ambulatorie. I gruppi sistematici più significativi, dal punto di vista della vita edafica, sono: Crustacea, Insecta (Hexapoda), Chilopoda, Diplopoda, Pauropoda e Symphyla, Miriapoda. In particolare, per la classe Crustacea si considera solo l'ordine Isopoda che comprende le poche specie che hanno colonizzato le terre emerse. Tra i numerosi ordini appartenenti alla Classe Hexapoda, quelli che hanno i maggiori rapporti col suolo sono: Diplura, Protura, Collembola, Dermaptera, Orthoptera, Blattoidea, Psocoptera, Hemiptera, Thysanoptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera.

Gli isopodi, come appena accennato, sono un ordine della classe dei Crustacea che comprende le poche specie che hanno colonizzato le terre emerse. Come gli altri crostacei hanno due paia di antenne ma il primo paio è spesso corto e difficilmente visibile. Hanno un corpo appiattito ed i segmenti del tronco presentano delle espansioni laterali laminari (epimeri) e alcune specie, per difendersi, si arrotolano tipicamente a palla. Hanno sette paia di zampe ambulatorie. Sono legati all'umidità relativa dell'ambiente in cui vivono, mal tollerando condizioni aride e di conseguenza compiono frequenti spostamenti verticali nel terreno. Sono tipicamente onnivori poiché si cibano di detriti vegetali e animali ma anche di escrementi, alghe e funghi (Fig. 1.6).



Fig. 1.6 Morfologia di un isopode (da <http://it.wikipedia.org>).

I sinfili si presentano di colore bianco, molli, privi di ocelli e sono dotati di 15-22 piastre dorsali. La parte cefalica porta lunghe antenne pluriarticolate mentre il tronco presenta 12 paia di zampe ambulatorie terminanti con unghie doppie e due grossi cerci sull'ultimo metamero in cui si apre una ghiandola sericigena. La larva cresce dall'uovo con 6-7 zampe e acquista un nuovo segmento con un nuovo paio di zampe ad ogni muta. La loro densità è di poche centinaia di individui/m<sup>2</sup> e sono frequenti nei suoli umidi, porosi e ricchi di humus. Si nutrono di funghi, batteri, detriti vegetali e anche di radici arrecando occasionalmente danni a piante coltivate in pieno campo (barbabietola) e soprattutto in serra.

I chilopodi hanno la parte cefalica dotata di antenne pluriarticolate e un tronco lungo e appiattito, suddiviso in un numero vario di segmenti (da 15 a 181) ognuno dei quali, ad eccezione dei due terminali, reca un paio di zampe ambulatorie. Per questa caratteristica di possedere numerose zampe, sono comunemente chiamati centopiedi. Le appendici boccali sono costituite da un paio di mandibole, due paia di mascelle e le prime appendici del tronco, chiamate forcipule, che funzionano da artigli veleniferi nei confronti delle prede. Questi organi di presa, unitamente ai veloci movimenti di cui sono capaci, li rendono degli ottimi predatori degli altri invertebrati che vivono nella lettiera e nel suolo come gli Artropodi e i Nematodi. Alcune specie possono nutrirsi anche di foglie decomposte (*Lithobius sp.*). Si dividono in 4 ordini: Geophylomorpha, Scolopendromorpha, Litobiomorpha e Scutigleromorpha.

Geophylomorpha: privi di ocelli e con antenne di 14 articoli, il tronco, formato da segmenti tutti uguali, porta un numero di zampe che può variare da 31 a 181 mentre le



dimensioni possono andare da 9 fino a 200 mm. La larva che esce dall'uovo ha già l'aspetto dell'adulto, con lo stesso numero di appendici. Possono manifestare bioluminescenza (Fig. 1.7).



*Fig. 1.7 Morfologia di un chilopode appartenente all'ordine Geophylomorpha (da <http://it.wikipedia.org>).*

Scolopendromorpha: il numero di zampe può essere di 21 o 23 paia e i segmenti del tronco sono tutti uguali. Come nei geofilomorfi, la larva che esce dall'uovo ha lo stesso numero di segmenti e appendici (Fig. 1.8). Alcune specie tropicali raggiungono i 25 cm.



*Fig. 1.8 Morfologia di un chilopode appartenente all'ordine Scolopendromorpha (da <http://it.wikipedia.org>).*

Litobiomorpha: diversamente dagli altri due ordini precedenti, la larva che esce dall'uovo ha soltanto 7 paia di zampe e acquista le restanti con mute successive. Le zampe, piuttosto corte, sono in numero di 15 paia. In questo gruppo appartengono i chilopodi più piccoli con dimensioni che vanno da 20 a 32 mm. Sono predatori di altri invertebrati ma possono cibarsi anche di foglie decomposte (Fig. 1.9).



*Fig. 1.9 Morfologia di un chilopode appartenente all'ordine Litobiomorpha. (da <http://it.wikipedia.org>).*

Scutigeroidea: come nel gruppo precedente l'adulto ha zampe in numero di 15 paia e la larva che esce dall'uovo ne presenta 7 paia. Le zampe sono molto lunghe e per questo sono dei veloci corridori. Alcune specie frequentano le abitazioni umane dove cacciano ragni ed altri insetti (Fig. 1.10).



*Fig. 1.10 Morfologia di un chilopode appartenente all'ordine Scutigeroidea (da <http://it.wikipedia.org>).*

I diplopodi (Fig. 1.11a) presentano un corpo lungo e cilindrico; la parte cefalica presenta un paio di antenne corte, un paio di mandibole ed un paio di mascelle che si fondono per formare un complesso lamellare, il gnatochilario. Il tronco si divide in torace e addome: il torace è formato da 4 segmenti che, tranne il primo, portano ciascuno un paio di zampe ambulatorie, l'addome è formato da un numero vario di doppi segmenti fusi, da 9 a più di 100, ognuno dei quali reca due paia di zampe. Sono volgarmente chiamati millepiedi. La larva che sguscia dall'uovo ha soltanto 3 paia di zampe toraciche. Hanno gli ocelli ma sono lucifughi e vivono in luoghi umidi dove si nutrono di foglie decomposte e legno marcio; alcune specie sono fitofaghe e possono arrecare danni occasionali alle colture. Hanno una cuticola sclerificata impregnata di carbonato di calcio ad eccezione di *Polixenus sp.* che ha tegumento molle con grandi ciuffi di setole laterali (Fig. 1.11b).

Alcune specie, corte ed ovali, per difendersi si arrotolano a palla. I diplopodi sono detritivori molto attivi e importanti perché assimilano solo il 6-7% delle sostanze ingerite, lasciando il resto dell'opera degradatrice di funghi e batteri.



Fig. 1.11 a) Morfologia di un diplopode a sinistra, a destra in dettaglio la parte cefalica; b) *Polixenus sp.* (da <http://it.wikipedia.org>).

Insieme agli acari, i collemboli costituiscono la maggior parte degli Arthropoda che vivono nel suolo, colonizzando praticamente tutti gli ambienti, dal deserto all'Antartide (Menta, 2008).

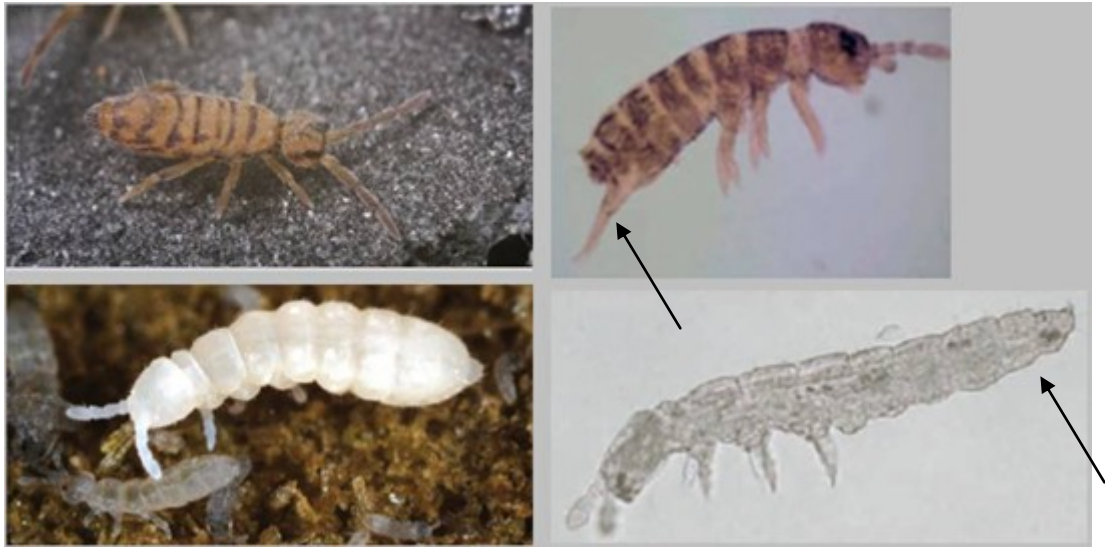
I collemboli (Fig. 1.12) sono nell'insieme cosmopoliti; la maggioranza delle specie vive nel suolo, nella vegetazione in decomposizione, nel detrito. Sono insetti atteri ed hanno dimensioni variabili tra 0,2 e 5 mm. Il capo presenta antenne costituite da 4 o 6 articoli e apparato boccale più spesso masticatore ma talvolta anche pungente-succhiante.

Quello che caratterizza maggiormente quest'ordine sono l'addome, formato da soli 6 segmenti che possono essere tutti distinti o parzialmente fusi (generalmente di 10 – 11 segmenti per gli altri insetti), il tubo ventrale, sul primo segmento addominale, il cui ruolo non si è ancora potuto determinare con certezza, tra le varie ipotesi dimostrate sembra essere quello della regolazione del bilancio idrico dell'animale, assorbendo o eliminando acqua quando necessario, oppure utilizzato come organo adesivo. Il terzo segmento addominale porta appendici parzialmente fuse a formare un retinacolo che aggancia un'appendice bifida del quarto segmento addominale, la furca che si comporta come un organo saltatorio: rilasciata dal retinacolo, la furca sbatte sul substrato facendo compiere all'insetto un salto di decine di volte le proprie dimensioni. Gli organismi che vivono negli strati profondi (forme euedafiche) presentano numerosi adattamenti morfologici al suolo come per esempio miniaturizzazione, depigmentazione, presenza di tegumenti poco ispessiti, anoftalmia, riduzione della lunghezza degli arti e delle antenne, perdita di setole, scaglie, sviluppo di pressocettori, chemiocettori e igrocettori. Nelle forme euedafiche la furca si riduce o addirittura scompare (Fig. 1.12).

La lunghezza del ciclo vitale dei collemboli varia parzialmente in relazione alle specie. Generalmente lo sviluppo avviene in un anno ma in alcuni casi, in questo arco di tempo si possono osservare anche due o più generazioni. Dall'uovo esce la forma larvale che è del tutto simile all'adulto, tranne che per le dimensioni. L'accrescimento avviene per mute successive fino allo stadio adulto.

Dopo gli acari sono gli Arthropoda del suolo più numerosi arrivando a densità di decine di migliaia per metro quadro.





*Fig. 1.12 Varie forme biologiche di collemboli:*

in alto a sinistra: forma *epigea*

in alto a destra forma: *emiedafica* (la freccia indica la presenza di furca)

in basso: forme *euedafica* (la freccia indica la furca assente)

(da *European Atlas of Soil Biodiversity*, European Union, 2010).

I dipluri hanno il corpo allungato con due antenne molto sviluppate, sono bianchi, privi di ocelli, dal tegumento fragile. L'addome di 11 uriti (segmenti addominali) termina con due cerci caratteristici e differenti in base alle specie: nel genere *Campodea* sono allungati e pluriarticolati, nel genere *Japyx* invece sono uni articolati e conformati a forcipe. Vivono nei suoli umidi e si nutrono di piccoli Artropodi, detriti vegetali, alghe e funghi. *Japyx* preda piccoli invertebrati utilizzando i cerci. I cerci fragili e filamentosi di *Campodea*, come pure le antenne, possono rompersi nell'operazione di estrazione dal suolo. Dall'uovo esce una forma praticamente uguale all'adulto (Fig. 1.13).



*Fig.1.13 Morfologia di un dipluro (da Menta C., foto di F.D. Conti).*

I proturi sono gli unici insetti a non avere le antenne la cui funzione è sostituita dal primo paio di zampe che sono tenute sollevate e rivolte in avanti. La parte cefalica è appuntina e priva di ocelli, il corpo è allungato, bianco-giallastro e poco sclerificato. Hanno un lungo addome di 11 segmenti più un telson, sostenuto da tre paia di residui di vere zampe portati dai primi tre uriti (stili). Hanno un apparato boccale con appendici conformate a stiletto e quindi adattate a pungere e a nutrirsi di fluidi. La loro dieta è poco conosciuta e si presuppone che siano dei predatori. Sono molto adattati a vivere nel suolo e preferiscono terreni umidi e ricchi di sostanza organica (Fig. 1.14).



*Fig. 1.14 Morfologia di un proturo (da <http://www.agraria.org>).*

I tisanotteri sono insetti con la parte cefalica tipicamente di forma sub-quadrangolare e apparato boccale pungente-succhiante. Il nome dell'origine deriva dalle ali sottili dotate di una frangia di setole ma esistono anche forme attere (Fig. 1.15).



*Fig. 1.15 Morfologia di un tisanottero (datp://www.entomologiitaliani.net).*

I coleotteri (Fig. 1.16) sono il più numeroso gruppo di animali conosciuto (300 mila specie) con le seguenti caratteristiche: antenne di 8-11 articoli, primo paio di ali fortemente sclerificate chiamate elitre a protezione del secondo paio di tipo membranoso, apparato boccale masticatore tipico, corpo generalmente sclerificato. Le forme adattate al suolo hanno in genere colore bruno, cuticola semitrasparente, riduzione delle dimensioni e dell'apparato visivo. Spesso sono le larve le forme che passano la maggior parte della loro vita nel suolo mentre gli adulti lo frequentano per cacciare, svernare o deporvi le uova. Possono essere predatori, fitofagi e saprofagi. La larva dei coleotteri ha capsula cefalica sviluppata con antenne di 1-4 articoli, tre paia di zampe tranne i Curculionidi che hanno larva apoda. Una famiglia molto comune nel suolo è quella degli Stafilinidi caratterizzati dall'avere elitre molto corte e dall'essere privi di cerci addominali.

Altre famiglie comuni del terreno sono i carabidi che hanno zampe lunghe perché sono veloci predatori e corridori; le larve sono di forma allungata con sei zampe, mandibole falciiformi. Silfidi e isteridi hanno antenne clavate formate da espansioni

lamelliformi appiattite. I curculionidi hanno la capsula cranica che si allunga in un rostro che porta le antenne e in punta le appendici boccali.

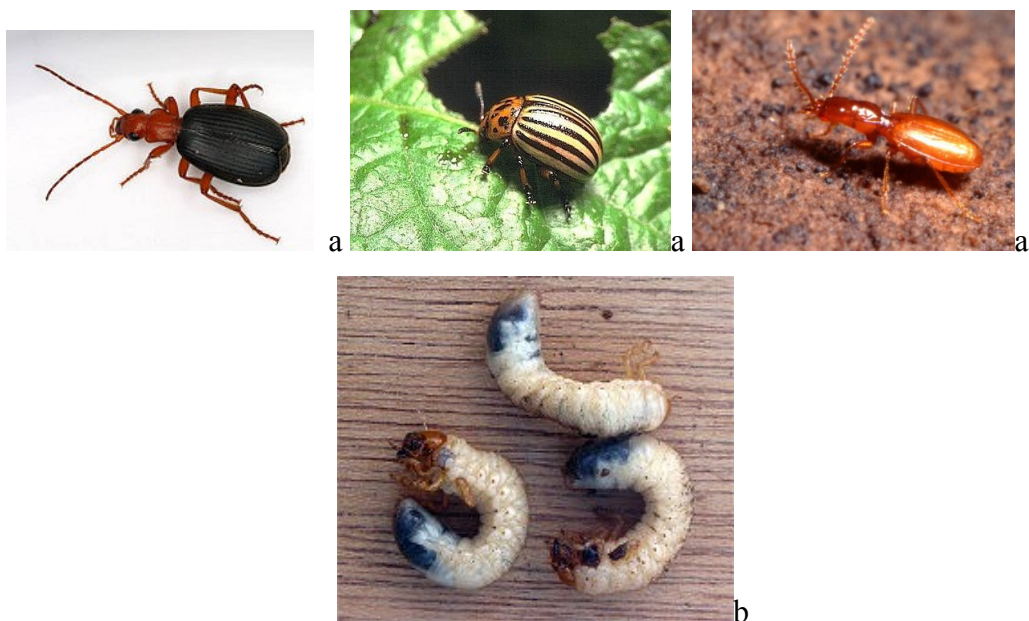


Fig.1.16 a)Varie morfologie di coleotteri (da <http://it.wikipedia.org>; <http://www.adnkronos.com>; [www.dolomitipark.it](http://www.dolomitipark.it)) b) larve.

Gli imenotteri sono un vasto ordine di insetti in genere ben adattati al volo con due paia di ali membranose. Il capo, molto mobile, è sostenuto da un peduncolo sottile; hanno mesotorace sviluppato e robusto, addome sessile e pedunculato, fornito negli individui femminili di un ovopositore che in alcuni gruppi si trasforma in aculeo. Il suolo è frequentato da larve ma soprattutto dalle formiche, insetti sociali che costruiscono nidi nel terreno con suddivisione del lavoro da parte di caste diverse. Le formiche sono attere ad eccezione dei maschi e della regina quando compie il volo nuziale. Possono nutrirsi di semi, funghi, vegetali o comportarsi da predatrici.

Altro gruppo considerato, appartenente al phylum degli Anellida, sono gli oligocheti.

Il corpo degli anellidi oligocheti è allungato e metamerico, cioè costituito da una serie di segmenti simili tra loro, separati esternamente l'uno dall'altro da un lieve restringimento. Nel corpo si riconoscono tre regioni: il prostomio, anteriore, contiene il cervello e gli organi di senso, il tronco, contenente l'apertura boccale ventrale nel primo segmento e il pigidio, regione posteriore del corpo, che porta l'ano. Nel suolo si



rinvengono con densità anche molto elevate anellidi oligocheti. Le circa 3500 specie di oligocheti sono costituite da lombrichi e da molti organismi dulcicoli e marini di piccole dimensioni (Fig. 1.17).

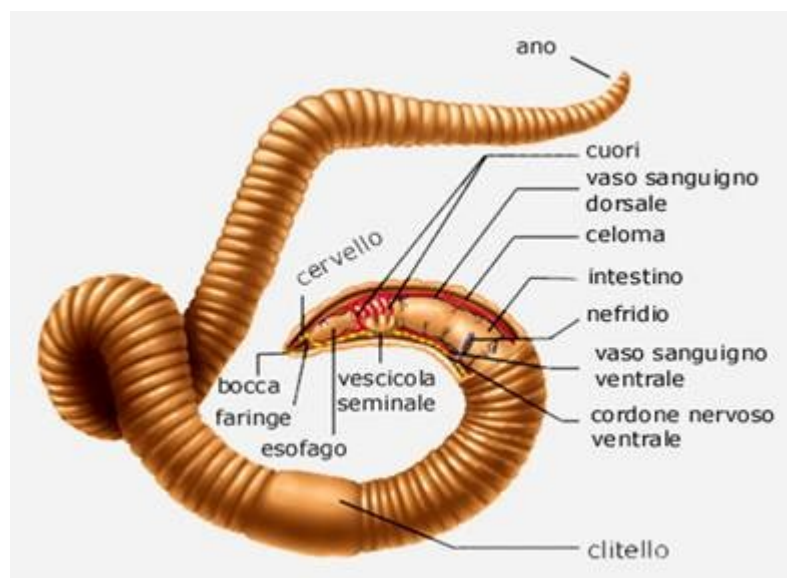


Fig. 1.17 Schema anatomico di un Lumbricidae (da <http://www.supermeteo.com> a cura di Sara Nutricato).

La famiglia Lumbricidae comprende circa 200 specie, di cui 75 sono presenti in Italia (Minelli et al., 1995). I lombrichi presentano corpo vermiforme e diviso in segmenti sui quali sono presenti poche setole; negli adulti si nota un ingrossamento a forma di manicotto lungo 4-10 metameri, detto clitello, struttura che secerne la capsula (bozzolo o coccone) in cui vengono contenute le uova al termine della deposizione (Fig. 1.18 a e b).

Già Charles Darwin nel trattato del 1882, *La formazione delle terra vegetale per l'azione dei lombrichi, con osservazioni intorno ai loro costumi*, aveva messo in evidenza come i lombrichi siano estremamente importanti per il suolo, sia per la loro azione nel ciclo del detrito e sulla struttura, sia per la loro notevole dimensione in termini di biomassa. Ad esempio, in alcuni suoli della Gran Bretagna, la specie *Lumbricus terrestris* raggiunge biomasse di 2,5 t/ha (Killham, 1994).



Fig.1.18 a) *Lombrico della specie Eisenia andrei* (da Bacchi S.); b) bozzolo (da <http://www.pronatura.ch>).

Questi animali prediligono suoli umidi e ricchi di sostanza organica, come quelli forestali, fuggono le temperature estreme e nelle stagioni aride le specie che sono efficienti scavatori, come *Lumbricus terrestris*, si rifugiano in profondità nel terreno umido, mentre, nelle specie di superficie come *Allolobophora caliginosa* (*Nicodrilus caliginosus*) ed *Eisenia rosea* si registra un netto calo della popolazione. Altro fattore che condiziona la presenza dei lombrichi nel suolo è l'ossigenazione; in genere le specie non sopportano lunghi periodi di sommersione ed evitano i terreni asfittici. La tolleranza ai diversi valori di pH è molto diversa nelle varie specie; la maggior parte dei lombrichi predilige suoli neutri, ma alcune specie come *A. caliginosa* e *A. longa* (*Nicodrilus longa*) si adattano a condizioni acide, garantendo quindi la presenza dei lombrichi in quasi tutti i suoli.

Oltre che con una classificazione tassonomica è utile suddividere i lombrichi in gruppi ecologico-funzionali come quelli proposti da Bouché (1972).

In questo modo possiamo riconoscere tre gruppi di lombrichi diversi per dimensioni, capacità di scavo, tipo di alimentazione ed habitat: epigei, endogei ed anecici (Fig. 1.19).

Gli epigei, di dimensioni comprese tra 0,5 e 5 cm, presentano il corpo di colore rosso, sono poco adatti allo scavo e tollerano bene bassi valori di pH. Abitano gli orizzonti organici superficiali, dove si nutrono della lettiera.

Gli endogei, di dimensioni comprese tra 1 e 8 cm, hanno il corpo depigmentato; l'esposizione a terreni con pH inferiori a 5 ne limita l'attività.

Abitano i primi centimetri di suolo minerale, nutrendosi di composti umici e radici morte, sono scavatori abili e costruiscono gallerie che si sviluppano principalmente in orizzontale.

Gli anecici, di dimensioni generalmente superiori a 5 cm e corpo di colore rosa-bruno, sono ottimi scavatori, costruiscono gallerie verticali che possono raggiungere anche il metro di profondità; tendono a evitare i terreni asfittici e con umidità scarsa. Vivono nello strato minerale del suolo ma risalgono in superficie, principalmente di notte, per nutrirsi di lettiera.

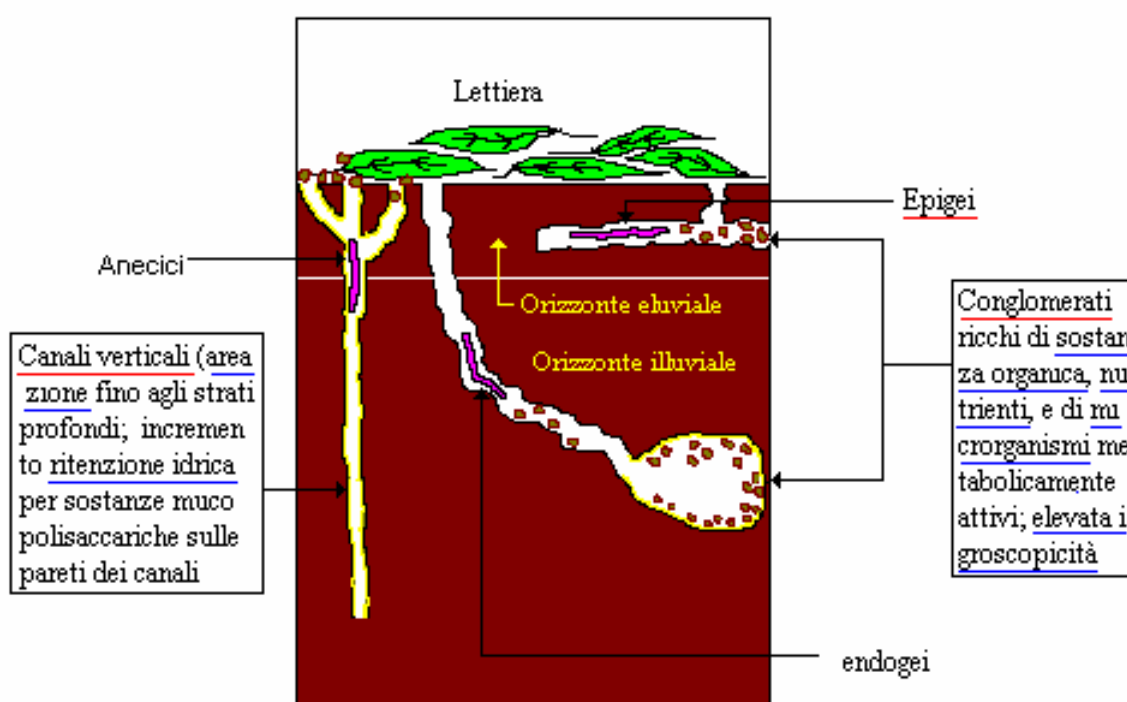


Fig. 1.19 Rappresentazione schematica dei lombrichi epigei, endogei ed anecici (da <http://www.supermeteo.com> a cura di Sara Nutricato).

L'azione dei lombrichi produce un effetto notevole non solo sulla struttura ma anche sulla composizione chimica del suolo, in quanto gran parte della materia organica ingerita dai lombrichi viene restituita in forma facilmente utilizzabile dalle piante. Mentre si nutrono, i lombrichi ingeriscono anche una notevole quantità di sostanze minerali (scarsa per gli epigei), che vengono poi miscelate alla sostanza organica digerita e, dopo essere state cementate da un muco proteico, vengono espulse in ammassi detti casts.

I casts oltre ad essere ricchi di azoto e di altre sostanze nutritive come calcio, magnesio e potassio, contengono anche una grande quantità di batteri non digeriti che proliferano facilmente in questo substrato e contribuiscono all'umificazione e alla mineralizzazione della sostanza organica (Zanella et al., 2001). Oltre che con in casts, i lombrichi contribuiscono all'aumento della quantità di azoto presente nel terreno con l'escrezione di ammoniaca e urea, forme direttamente utilizzabili dalle piante; inoltre, una notevole quantità di azoto viene ceduta al terreno con la morte dell'animale, che è costituito per il 72% da proteine (Dindal, 1990).

E' importante notare che i casts spesso non sono rilasciati nello stesso strato in cui il lombrico si nutre; in effetti i componenti del gruppo degli anecici vivono in profondità e rilasciano in superficie le feci ricche di minerali. All'opposto, gli endogei abitano la superficie e rilasciano più in profondità le feci, ancora ricche di sostanza organica. Questi comportamenti, uniti all'azione diretta dovuta allo scavo, garantiscono il rimescolamento del terreno e un conseguente aumento di fertilità.

L'attività di scavo dei lombrichi inoltre è fondamentale per aumentare l'aerazione del suolo e migliorare la circolazione dell'acqua, in quanto le loro gallerie aumentano del 20-30% la porosità del terreno (Zanella et al., 2001), consentendo agli organismi non buoni scavatori di spostarsi agevolmente anche negli strati profondi di suolo.

La maggior parte dei lombrichi è ermafrodita a fecondazione incrociata, come i generi *Allobophora* e *Lumbricus*, nei quali, durante l'accoppiamento, ogni partner feconda le uova dell'altro; altre specie sono partenogenetiche facoltative, come quelle appartenenti ai generi *Dendrobaena*, oppure partenogenetiche obbligate, come i generi *Octolasion* ed *Eiseniella*.

Dopo l'accoppiamento, il clitello secerne un manicotto chitinoso, che scivola lungo il corpo dell'animale fino all'apertura genitale femminile, dove vengono deposte le uova, e alla spermateca, dove vengono fecondate. A questo punto il manicotto viene chiuso e forma una capsula protettiva, detta coccone, che viene deposta nel terreno e nella quale si svilupperanno gli embrioni. Nel 1948 Evans e Guild (in Wallwork, 1970) hanno dimostrato che esiste una relazione tra il tipo di ambiente in cui una specie vive e il numero di cocconi prodotti. Infatti, specie che scavano gallerie profonde, come ad esempio *Allobophora nocturna*, *A. longa*, *Octolasion cyaneum* e *L. terrestris*, producono un numero di cocconi che va da 3 a 13 l'anno; mentre le

specie della fascia superficiale, come *L. rubellus*, *L. castaneus*, *Dendrobaena subrubiconda*, producono da 42 a 106 cocconi l'anno.

La durata del periodo di incubazione è molto diversa sia da specie a specie sia a seconda della temperatura del terreno; la presenza di sostanza organica invece è un fattore fondamentale, che incide sul ritmo di sviluppo e sul tasso di mortalità dei giovani. Il periodo riproduttivo è sincronizzato con questi parametri ambientali e ciò viene suggerito dalla presenza, generalmente, di due picchi nella densità di popolazione: uno primaverile più modesto e uno più marcato in autunno; è proprio questa la stagione che fornisce condizioni di umidità, temperatura e disponibilità di sostanza organica ideale per i lombrichi.

Dopo la nascita, i lombrichi si sviluppano con un graduale aumento delle dimensioni corporee, fino allo stadio di adulto in cui si forma il clitello. I lombrichi adulti sono generalmente molto longevi e sopravvivono per vari anni.

## **1.5 Studi di campo sull'utilizzo degli invertebrati del suolo come indicatori biologici**

In generale, la valutazione della qualità del suolo è un questione complessa perché dipende dalla combinazione di fattori fisici, chimici e biologici che contribuiscono alla qualità ed alla funzione stessa del suolo, modificata poi dagli effetti di lunga durata come per esempio il suo uso storico (Knoepp et al., 2000). Tra i fattori più importanti da considerare nel suolo sono la sua composizione mineralogica, il pH, la CE, la tessitura, la porosità, la materia organica, la biomassa microbica. Questi fattori poi interagiscono tra di loro dando origine ai processi biogeochimici (Dylis, 1964; Angermeier e Karr, 1994; Dale e il Beyeler, 2001). Se considerati individualmente, questa moltitudine di fattori e le loro interazioni appaiono troppo complicate al fine di valutare la qualità del suolo. A questo punto quindi, gli scienziati si sono rivolti all'uso di indici, i più frequentemente utilizzati sono ad esempio gli indicatori chimici relativi al ciclo della materia organica del suolo (Mouat et al, 1997; Haynes, 2000; Loveland e Webb, 2003); tra gli indicatori fisici, la stabilità degli aggregati

(Seybold e Herrick, 2001; Li et al, 2007) e la densità di massa (Logsdon e Karlen, 2004; Shukla et al, 2006; Reynolds et al, 2007).

Altri indicatori comunemente usati includono la mineralizzazione dell'azoto, la biomassa microbica, biomassa microbica su rapporto totale di carbonio e le aliquote della decomposizione della lettiera (Duxbury e Nkambule, 1994; Linden et al, 1994; Rice e Garcia, 1994; Sparling, 1997; Van Straalen, 1998; Knoepp et al, 2000). Nonostante il grande numero di indicatori ambientali proposto (250 solo dall'Organizzazione per la cooperazione economica e sviluppo, come illustrato in OECD, 1999, 2000, 2001), esistono carenze straordinarie, soprattutto per quanto riguarda gli indicatori per gli aspetti biotici del suolo (CEC, 2000; Buchs, 2003).

Recentemente, diversi autori hanno proposto nuovi metodi per la valutazione della qualità del suolo basata sulle comunità della mesofauna, in particolare gli artropodi (Blocksom e Johnson, 2009; Baldigo et al., 2009).

Alcuni di questi metodi sono basati su un unico taxon (ad es. Graham et al., 2009), mentre altri si basano su una valutazione generale degli artropodi (Buchs et al., 2003; Bardgett e Cook, 1998).

Nell'ottica di un approccio "un taxon – un indice", sono stati spesso utilizzati come indicatori biologici diversi gruppi quali imenotteri, collemboli e carabidi. Al contrario, l'indice QBS-ar, che in questo lavoro è stato impiegato, è stato recentemente proposto come un approccio innovativo perché integrato. Esso infatti si basa sul seguente concetto: più alta è la qualità del suolo, maggiore sarà il numero dei gruppi di microartropodi trovati, che sono a loro volta ben adattati al suolo in cui vivono e che quindi sono in grado di darci importanti informazioni su di esso. Questo indice tiene conto di tutti i microartropodi che si possono trovare nel suolo e quindi la valutazione della qualità si basa anche sulla diversità biologica, come raccomandato da Duelli e da Obrist (2003).

Fino ad oggi, poche applicazioni che riguardano il QBS-ar sono state pubblicate (Parisi, 2001; Gardi et al., 2002; Parisi et al., 2005). In Italia, il QBS-ar è già ampiamente adottato dall'Agenzia Nazionale per la Protezione Ambientale per ciò che riguarda soprattutto i suoli agricoli dato che si è dimostrato uno strumento utile per descrivere la qualità del suolo in quanto facile da applicare, da interpretare e da comunicare ai servizi pubblici (ad esempio Jacomini et al., 2000, ANPA, 2001).

Tuttavia, non è chiaro quanto grande un'area o per quanto tempo è necessario ripetere il monitoraggio per valutare l'eventuale effetto sulla qualità del suolo con l'indice QBS-ar. Uno studio recente al riguardo è quello di Aspetti et al., 2010 dove è stata valutata la stabilità e ripetibilità dell'indice QBS-ar nel tempo.

In Francia, per esempio, si è cercato di stabilire una relazione tra le comunità di macroinvertebrati del suolo in terreni che presentano un inquadramento pedologico diverso. Un indicatore della qualità del suolo è stato quindi sviluppato dal calcolo delle abbondanze dei taxa (IBQS, Indice Biotique de la Qualité du Sol). In generale l'Unione europea è comunque in procinto di proporre un quadro giuridico per migliorare la protezione del suolo, mentre i sistemi per il monitoraggio della qualità del suolo si stanno sviluppando piuttosto rapidamente (Arrouays et al., 2003).

A livello internazionale si può citare un lavoro simile come per esempio l'indicatore biologico della qualità del suolo (BISQ) che propone una rappresentazione grafica di un insieme di variabili legate alle funzioni del suolo: dalla decomposizione della materia organica, al ciclo dei nutrienti, alla biodisponibilità dei nutrienti, alla struttura del suolo (Breure et al., 2004). Sono state proposte anche misure della diversità biologica del suolo considerando a livello faunistico gruppi appartenenti a grandi taxa (Klemens et al., 2003; Ruiz-Camacho, 2004).

A tal proposito è da sottolineare che utilizzare le specie negli indicatori biologici richiedono un elevato livello di competenza e ciò rappresenta un grave ostacolo alla loro applicazione e diffusione (Bongers e Ettema, 1993; Breure et al, 2004; Gardi et al., 2002; Klemens et al, 2003).

## **1.6 Metodi basati su test di laboratorio**

### **1.6.1 Ecotossicologia**

L'ecotossicologia è la scienza che, utilizzando metodi e concetti propri della tossicologia, applica i principi dell'ecologia e della chimica ambientale allo studio degli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi. Inizialmente l'impiego di test biologici era rivolto unicamente alla definizione di ciò che era accaduto in passato,

attualmente la prospettiva nella quale si inseriscono i test biologici include l'approccio predittivo, utilizzando le analisi come strumento previsionale per la valutazione del rischio ambientale (APAT, 2002). Un saggio ecotossicologico è una prova che utilizza un sistema biologico come bersaglio. Essa richiede che un organismo vivente sia posto a contatto per un determinato tempo ad una sostanza in esame e che si valuti la risposta mostrata dall'organismo (Maffiotti *et al.*, 1997). Le determinazioni per valutare la tossicità dei suoli possono essere condotte sia direttamente sulla matrice solida sia su campioni di estratto acquoso.

## **1.6.2 Test ecotossicologici standardizzati**

### **1.6.2.1 Determinazioni sulla matrice liquida**

L'utilizzo dell'elutriato nasce da varie considerazioni, come l'importanza della fase acquosa all'interno della matrice suolo nella produzione dell'effetto tossico e quale sistema di trasporto delle sostanze tossiche da e verso altri comparti ambientali. Le prove di tossicità su elutriato, ottenuto dal campione in esame, sono prevalentemente rivolte a evidenziare la presenza e la biodisponibilità di contaminanti inorganici e microinquinanti metallici idrosolubili. In base a quanto riportato dalla guida tecnica sui metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati, con particolare riferimento agli indicatori ecotossicologici e biologici, redatto da APAT (2002), le principali prove di tossicità sulla matrice liquida sono:

- prova di tossicità con *Vibrio fischeri*, mediante la quale viene valutata la tossicità acuta di un campione acquoso, tal quale o diluito, verificando tramite luminometro l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa da una popolazione monospecifica di cellule di batteri Gram-negativi appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*, dopo un tempo di contatto di 15 minuti con il campione in esame, tal quale o diluito. I risultati possono essere espressi come inibizione percentuale (I%) e/o come concentrazione efficace ad indurre un'inibizione della bioluminescenza pari al 50% (EC50);



- prova di tossicità con *Daphnia magna*, determinando l'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Viene valutata la concentrazione del campione che immobilizza il 50% degli organismi testati dopo 24 ore ed eventualmente dopo 48 ore (EC50 24 h; EC50 48 h);
- prova di tossicità con *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*), che permette di evidenziare l'effetto tossico cronico mediante l'inibizione di crescita della specie *Selenastrum capricornutum* Printz, recentemente rinominata *Pseudokirchneriella subcapitata*, un'alga verde monocellulare (Chlorophyceae) appartenente all'ordine Chlorococcales, rispetto ad un controllo (UNI EN, 1993).

#### **1.6.2.2 Determinazione sulla matrice solida**

Le prove di tossicità condotte direttamente sulla matrice solida hanno il vantaggio di utilizzare la matrice in toto e non solo l'estratto acquoso, avvicinandosi in tal modo maggiormente alla situazione reale. Tuttavia, esse risentono delle interazioni tra il suolo e la componente tossica, interazioni che esercitano effetti non trascurabili sulla biodisponibilità delle sostanze tossiche. Per valutare la qualità dei suoli con questo tipo di saggi si possono utilizzare come specie bersaglio sia i vegetali che gli animali. I test di tossicità su piante sono generalmente metodi veloci che richiedono un impegno economico molto contenuto, offrendo la possibilità di evidenziare l'effetto contemporaneo di più agenti inquinanti, come spesso accade in una reale situazione di inquinamento. Le piante utilizzate per questi tipi di saggi sono definite piante indicatrici in quanto rispondono con sintomi evidenti all'azione di uno o più inquinanti. Esse devono possedere una bassa selettività all'assorbimento di sostanze tossiche e non devono essere accumulatrici degli inquinanti nei propri tessuti, perché altrimenti non potrebbero essere utilizzate per un saggio diretto e veloce, ma si dovrebbe effettuare l'analisi chimica dei loro organi (APAT, 2002). Sempre secondo

quanto riportato dalla guida tecnica dell'APAT (2002), alcuni dei metodi più comunemente utilizzati come test di tossicità su piante sono:

- metodo per la misura dell'inibizione della crescita radicale, si basa sulla stima della crescita radicale di semi fatti germinare in condizioni controllate. Dopo il periodo di crescita viene misurata la lunghezza radicale delle piante cresciute sul suolo oggetto del saggio in riferimento ad un controllo. Il metodo dà risultati positivi se viene determinata una differenza statisticamente significativa tra le lunghezze radicali delle piantine appartenenti alle diverse tesi (ISO 11269 parte I, 1993);
- test di germinazione e allungamento radicale, basato sulla determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in due dicotiledoni, *Cucumis sativus* (Cetriolo) e *Lepidium sativum* (Crescione), e una monocotiledone, *Sorghum saccharatum* (Sorgo). Il saggio, della durata di 72 ore, consente di rilevare contemporaneamente due diversi effetti (germinazione ed allungamento radicale). I semi delle due dicotiledoni (Cetriolo e Crescione) e della monocotiledone (Sorgo) vengono esposti al campione ed incubati al buio alla temperatura di  $25 \pm 2$  °C per 72 ore. Al termine dell'esposizione, vengono contati i semi germinati e mediante un righello viene misurata la lunghezza (al più vicino millimetro) dell'apparato radicale emerso dai semi. L'effetto sulla germinazione ed allungamento radicale viene espresso come Indice di Germinazione percentuale (IG%).

Per quanto riguarda i saggi su animali, comunemente meno sensibili rispetto alle piante per rilevare le caratteristiche del suolo in una specifica area, in riferimento alla guida tecnica dell'APAT (2002), i principali metodi d'indagine sono:

- test di riproduzione sul lombrico (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*), saggio di laboratorio in cui il campione in esame viene aggiunto a un terreno artificiale dove vengono posti lombrichi adulti della specie *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei*, quali specie rappresentative

dei lombrichi. Dopo quattro settimane di esposizione sono determinati la mortalità e gli effetti sulla crescita su lombrichi adulti. Gli adulti sono rimossi dal suolo e gli effetti sulla riproduzione sono valutati dopo altre quattro settimane, contando la discendenza presente nel suolo. Il tasso di riproduzione dei lombrichi presenti nel terreno da testare è paragonato a quello del controllo.

- -saggio di tossicità/genotossicità con *Panagrellus redivivus*, che valuta l'impatto dei contaminanti contenuti in fase solida (suolo, sedimenti, fanghi di depurazione, ecc.) sul nematode *Panagrellus redivivus*, molto sensibile negli screening di routine per la valutazione della contaminazione chimica acuta o cronica (McInnis, 1995).

## 1.7 I biomarker

Il biomonitoraggio mediante organismi sentinella e l'analisi delle loro risposte all'esposizione all'ambiente, definite biomarker, offrono informazioni precoci, utilizzabili per programmare interventi tempestivi e seguire le azioni di risanamento. Sia la UE che l'UNEP hanno supportato in questi anni la messa a punto di protocolli sperimentali adeguati (JAMP guidelines, 1998; UNEP Manual, 1999) per questo tipo di indagini. L'OECD (2004) ed Environment Canada EC, (2004) hanno recentemente aggiornato le linee guida per il monitoraggio dei suoli utilizzando i vermi come organismi sentinella e raccomandando nuovi test per la valutazione dello stato di salute.

I vermi terricoli sono sentinelle ambientali ideali in quanto rappresentano una componente molto abbondante nel suolo, ove giocano un ruolo essenziale nella funzionalità dell'ecosistema, aumentandone la strutturazione e la decomposizione del materiale organico; inoltre essendo gli invertebrati terricoli in diretto contatto con il

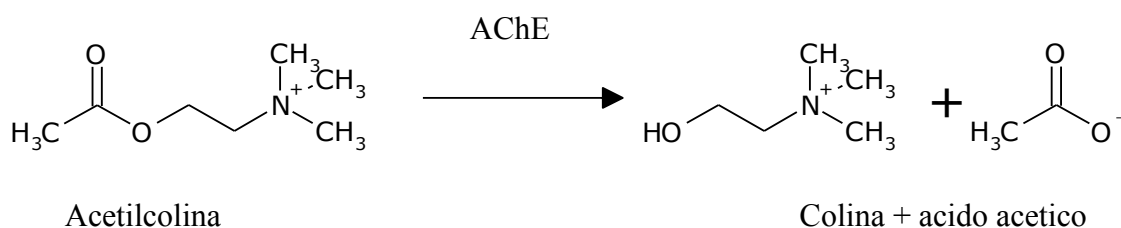
suolo stesso, la soluzione circolante e il cibo, la loro risposta in termini di biomarker è direttamente correlata alla frazione biodisponibile degli inquinanti nel suolo.

L'interesse per nuove metodologie volte a misurare la qualità dei suoli è presente anche a livello nazionale benché ancora in fase preliminare (ANPA - CTN\_SSC, 2000a, 2000b, 2001).

### 1.7.1 Valutazione dell'attività dell' acetilcolinesterasi (AChE)

L'acetilcolinesterasi (AChE) è un enzima che ha la funzione di idrolizzare l'acetilcolina, un neurotrasmettitore, in colina ed acido acetico, rimuovendola così dalle fessure sinaptiche ed impedendo l'anomalo protrarsi della neurotrasmissione (Fig. 1.20).

L'effetto devastante di molecole come i gas nervini è legato alla loro attività inibitoria nei confronti di AChE, che genera la stimolazione continua di muscoli, ghiandole e sistema nervoso centrale, causando la morte per paralisi respiratoria. I moderni insetticidi sintetici sono costituiti, in buona parte, da agenti anticolinesterasici come organo fosfati e carbammati, che svolgono la loro attività sulla AChE presente negli insetti. La valutazione dell'inibizione dell'attività dell'AChE viene utilizzata come biomarker specifico, nei recenti progetti di biomonitoraggio come ad esempio (Rao et al, 2003; Aamodt et al., 2007; Collange et al., 2010). Questi hanno dimostrato infatti che la tossicità è associata ad un accumulo di Clorpyrifos nei tessuti con conseguente inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi.



*Fig. 1.20 L'acetilcolinesterasi (AChE) idrolizza l'acetilcolina in colina + acido acetico.*

### **1.7.2 Stabilità delle membrane lisosomiali**

I lisosomi giocano un ruolo fondamentale come regolatori del catabolismo delle macromolecole (proteine, DNA, RNA, ecc.), nella demolizione di molecole endogene complesse e anche nella digestione di sostanze esogene e nell'eliminazione di porzioni della cellula di appartenenza.

Gli enzimi idrolitici dei lisosomi agiscono soltanto su sostanze assunte al loro interno e la membrana di tali organuli funge quindi da barriera rispetto al circostante citoplasma. Molti composti tossici, come ad esempio metalli pesanti, IPA e PCB, possono accumularsi in eccesso all'interno dei lisosomi, alterarne la funzionalità metabolica, destabilizzarne le membrane fino a danneggiare l'intera cellula. La destabilizzazione delle membrane lisosomiali può quindi essere interpretata come un indice di stress causato dagli effetti tossici dovuti alla presenza di contaminanti nell'ambiente.

Questo biomarker non è specifico per determinati tipi di agenti tossici, ma dal momento che inquinanti diversi possono avere effetti additivi o sinergici sulla destabilizzazione delle membrane lisosomiali, la valutazione della stabilità lisosomiale rappresenta l'integrazione dell'azione tossica delle diverse sostanze con cui gli organismi vengono a contatto.

La valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali viene determinata attraverso il saggio della ritenzione del rosso neutro (Neutral Red Retention Assay, NRRA), utilizzato sia per lo studio di organismi marini che per lo studio di invertebrati terrestri e di acqua dolce.

Il Neutral Red Retention Assay prevede che gli organismi siano sottoposti ad un'esposizione in vivo agli eventuali contaminanti e che da tali organismi vengano poi estratte cellule molto ricche di lisosomi e molto sensibili alle alterazioni ambientali (celomociti), su cui poi effettuare l'analisi.

Il fondamento della tecnica del NRRA si basa sulla capacità dei lisosomi di assorbire e trattenere al loro interno il rosso neutro, un colorante cationico, che solo i

lisosomi delle cellule sane sono in grado di bloccare stabilmente. I lisosomi delle cellule danneggiate tendono invece a rilasciare il Neutral Red nel citoplasma ad una velocità che è proporzionale al danno subito e che permette di quantificare l'entità dello stress.

### **1.7.3 Accumulo dei lipidi neutri insaturi nei lisosomi**

I lipidi sono macromolecole strutturalmente semplici che svolgono tipicamente una funzione di riserva energetica all'interno degli organismi. In concomitanza con l'aumento della concentrazione di sostanze tossiche nell'ambiente cellulare e lisosomiale, in particolare IPA e metalli pesanti, si è osservato un aumento della tendenza da parte dei lipidi neutri insaturi ad accumularsi all'interno dei lisosomi, in particolare a livello della cavità celomatica. Questo tipo di accumulo di derivati lipidici è direttamente legato all'aumento delle reazioni metaboliche, attivate in risposta alla presenza di sostanze tossiche da demolire e causa di una marcata alterazione nello stato redox cellulare.

La quantificazione dei lipidi neutri insaturi all'interno dei lisosomi viene effettuata attraverso un metodo citochimico su sezioni di lombrico dello spessore di 10  $\mu\text{m}$ , ottenute al criostato, trasferite su vetrini da microscopia e colorate con Oil Red. Le sezioni di verme sono state poi fotografate al microscopio (ingrandimento 40x) e analizzate con il software Scion Image (versione Beta 4.0.2) per calcolare la densità ottica del colorante che si è legato ai lipidi neutri all'interno dei lisosomi e valutare quindi il loro accumulo in  $\text{pixel}^2$ .

### **1.7.4 Accumulo delle lipofuscine nei lisosomi**

Le lipofuscine sono pigmenti fluorescenti, di derivazione lipidica, che si originano in seguito all'ossidazione degli acidi grassi poliinsaturi, di cui sono ricchi i tessuti, e costituiscono dei prodotti di reazione estremamente stabili e pressoché insolubili in ambiente cellulare. L'accumulo di lipofuscine nei lisosomi, in particolare a livello del tessuto cloragogeno, è anch'esso correlato alla presenza di sostanze tossiche

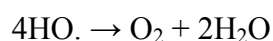
nell'ambiente cellulare e alla conseguente alterazione delle condizioni redox nell'ambiente lisosomiale.

La quantificazione delle lipofuscine all'interno dei lisosomi viene effettuata attraverso un metodo citochimico su sezioni di verme dello spessore di 10  $\mu\text{m}$ , ottenute al criostato, trasferite su vetrini da microscopia e colorate con una soluzione di cloruro di ferro 1% e ferrocianuro di potassio 1%. Le sezioni di verme sono poi state fotografate al microscopio (ingrandimento 40x) e analizzate con il software Scion Image (versione Beta 4.0.2) per calcolare la densità ottica del colorante che si è legato alle lipofuscine all'interno dei lisosomi e valutare quindi il loro accumulo in  $\text{pixel}^2$ .

### **1.7.5 Saggio dell'attività della catalasi**

La catalasi è un enzima, appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, coinvolto nella detossificazione della cellula da specie reattive dell'ossigeno.

In particolare catalizza la conversione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno:



Il perossido di idrogeno è un agente tossico per gli organismi viventi, e fra gli altri effetti è in grado di generare danni a carico dei lipidi di membrana. La misura dell'attività di questo enzima permette di individuare un eventuale stress ossidativo causato da agenti xenobiotici.

L'attività della catalasi è determinata misurando la diminuzione di assorbanza a 240 nm, dovuta al consumo di perossido di idrogeno. La reazione è seguita per due minuti e l'attività finale espressa come  $\mu\text{mol}/\text{min}$  per mg di proteine.

### **1.7.6 Valutazione dell'attività del glutathione S-transferasi (GST)**

Le glutathione S-transferasi (GSTs) sono una famiglia di isoenzimi appartenenti agli enzimi della fase II di detossificazione che catalizzano la coniugazione di varie molecole tossiche con il glutathione, rendendole meno reattive e più facilmente

eliminabili dall'organismo (Argese et al. 2004). Catalizza le reazioni di coniugazione di xenobiotici che hanno una regione elettrofila con il glutatione ridotto (GSH). La misura dell'attività di questo enzima detossificante permette di evidenziare la risposta degli organismi alla presenza di inquinanti nell'ambiente circostante che disturbino lo stato redox della cellula, ed è quindi utile come indicatore di inquinamento ambientale.

## **1.8 Studi di laboratorio sull'effetto della salinizzazione sugli invertebrati del suolo**

E' stato dimostrato che le caratteristiche del suolo, nutrienti, temperatura, umidità, stagione, e la presenza di ammendanti mista a pesticidi influenzano pesantemente la popolazione di lombrichi (Bhaskaram, 1986; Morgan, 1993; Vishwanathan, 1997).

I lombrichi rappresentano una frazione importante del suolo poiché rappresentano l'80% di biomassa e svolgono un ruolo importante nella struttura e nella fertilità del suolo (Edwards e Bohlen, 1996). Richiedono poche cure e sono poco esigenti tanto da renderli un gruppo maggiormente utilizzato quale specie target per indagini di tipo ecotossicologico (Hackenberger *et al.*, 2008).

In Europa attualmente vengono utilizzate prove di laboratorio standardizzate per valutare la tossicità di contaminanti in terreni su invertebrati terrestri (ISO 11268-1, 1993; ISO 11.268-2, 1998).

I test di laboratorio standardizzati attualmente disponibili sono quelli per la valutazione della riproduzione e mortalità del lombrico *Eisenia foetida* ed *Eisenia andrei*, del collembolo *Folsiomia candida* e dell'enchitreide *Enchytraeus albidus*.

Un ulteriore test, per valutare la riproduzione degli acari predatori (specie *Hypoaspis aculeifer*), è in via di sviluppo.

La maggior parte degli studi sugli organismi per valutare gli effetti della salinità o di inquinanti chimici si sono però concentrati per molti anni solo su una singola sostanza.

Tuttavia, in sistemi naturali, in particolare quelli agricoli, i fattori di stress ambientali, come salinità e l'utilizzo di pesticidi contenenti composti metallici od organofosforici



potrebbero essere presenti simultaneamente. Esperimenti di tossicità su miscele di inquinanti possono infatti riflettere l'effettivo inquinamento dell'ecosistema in un modo più realistico rispetto alla sperimentazione in cui sostanze tossiche sono state usate singolarmente (Spurgeon et al., 1994).

In Australia e Sud Africa, ad esempio, dove la salinizzazione del suolo agricolo è già un problema molto sentito, vengono utilizzati anche pesticidi contenenti metalli (Merry et al., 1983; Krause et al., 1996; Vermuelen et al., 2001). Pochi studi sono stati sin ora condotti sull'influenza della salinità sulla biodisponibilità di metalli. I dati pubblicati limitati disponibili, tuttavia, indicano che la salinità influenza la tossicità dei metalli pesanti per i policheti di ambienti acquatici (Bryan e Langston, 1992). Nel suolo, invece, la salinità tende ad aumentare la biodisponibilità dei metalli. E' stato dimostrato per esempio che la biodisponibilità del DTPA (di-etilene-triammina penta-acetico) di rame, zinco, manganese e piombo estraibili tendono ad aumentare con l'aumento dei livelli di salinità nel terreno naturale di origine asiatica (Kesharav et al., 2006) e nei fanghi di depurazione Parkpian et al. (2002). In particolare per lo zinco estraibile il DTPA è aumentato del 1-6,3% in relazione a crescenti livelli di salinità. Owojori et al. (2008) ha dimostrato che la salinità aumenta significativamente la biodisponibilità di DTPA e  $\text{CaCl}_2$  Zn estraibili nel suolo artificiale (OCSE).

Gli insetticidi invece che contengono composti organofosforici sono stati sempre più utilizzati in agricoltura come un sostituto agli insetticidi che presentano principi attivi quali organoclorurati e carbammati a causa della loro elevata efficienza e inferiore persistenza nell'ambiente. Per decenni in India, come in altri paesi del mondo è stato permesso l'uso prolungato di composti organofosforici per l'agricoltura provocandone la loro ampia commercializzazione e quindi diffusione nell'ambiente.

Tuttavia alcuni studi (Zhou et al., 2007) hanno dimostrato il contrario: il clorpyrifos infatti, potrebbe persistere nel terreno per periodi di tempo molto lunghi (Kuhr e Tashiro, 1978) fino a due anni nel suolo (Cox, 1995). I nuovi prodotti come pellets, che rilasciano gradualmente un basso contenuto di pesticidi nel terreno possono persistere fino a 18 mesi (Racke, 1993). Numerosi studi sono stati intrapresi per valutare la tossicità del clorpyrifos nei lombrichi (Rao et al, 2003; Aamodt et al., 2007; Collange et al., 2010). Questi hanno tutti dimostrato che la tossicità è associata ad un accumulo di clorpyrifos nei tessuti con conseguente inibizione dell'attività

dell'acetilcolinesterasi. L'ampio uso di clorpyrifos può quindi comportare un serio pericolo per l'ambiente.

## **2. OBIETTIVI**

Il presente lavoro si colloca all'interno del progetto CSI (Costal Salt Intrusion) diretto dal Prof. Gabbianelli e finanziato dall'ENI. Questo lavoro di tesi ha come obiettivo generale la valutazione degli effetti della salinizzazione del suolo sugli invertebrati terrestri, anche in combinazione con altri fattori di stress.

Tale valutazione è stata fatta seguendo in parallelo due attività di ricerca: una attività di campo nell'ambito della Pineta di San Vitale (Ravenna) ed una attività sperimentale di laboratorio.

L'attività di campo ha avuto come obiettivo specifico la valutazione della qualità biologica dei suoli della Pineta di San Vitale e più in generale lo studio della struttura del popolamento dei microartropodi edafici, anche in relazione all'ambiente chimico e fisico.

In particolare si è voluto operare in modo tale da rispondere alle seguenti domande:

- Come varia la qualità biologica del suolo (valutata con il metodo QBS-ar) e la composizione del popolamento lungo il gradiente che va dalle sommità dunali alle bassure interdunali? È possibile stabilire un pattern di variazione generale? È possibile individuare popolamenti tipici associati a ciascuno dei tre pedotipi Pirottolo, Cerba, S. Vitale?
- È possibile evidenziare un effetto della salinizzazione sull'indice QBS-ar e sulla composizione del popolamento? In particolare, la salinizzazione determina un'alterazione nel pattern di variazione del popolamento lungo il gradiente Pirottolo-S. Vitale?
- È possibile spiegare le differenze osservate nel popolamento sulla base delle caratteristiche chimiche e fisiche del suolo?

Questo studio potrebbe costituire anche una base per valutare l'evoluzione del fenomeno della salinizzazione nel tempo e l'efficacia di eventuali interventi attuati per contrastarla.

Sembra particolarmente importante documentare la situazione delle zone con suoli Cerba.

Si tratta infatti delle aree più estese all'interno della pineta e probabilmente più soggette a trasformarsi in conseguenza delle variazioni del livello della falda.

L'attività di laboratorio, invece, ha avuto lo scopo di determinare gli effetti combinati della salinizzazione e dell'insetticida organofosforico Chlorpyrifos sul lombrico *Eisenia andrei*, mediante l'esposizione, in condizioni controllate, a suoli inquinati sperimentalmente. Sono stati valutati sia gli endpoint del ciclo vitale, sia l'inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi.

In particolare, si è voluto operare in modo tale da rispondere alle seguenti domande:

- In presenza di suoli a diversi livelli di salinizzazione si hanno effetti sui parametri del ciclo vitale e sull'attività dell'enzima acetilcolinesterasi del lombrico *Eisenia andrei*?
- In presenza di suolo salinizzato e contaminato con Chlorpyrifos, è possibile osservare un'influenza della salinizzazione sulla tossicità dell'insetticida?

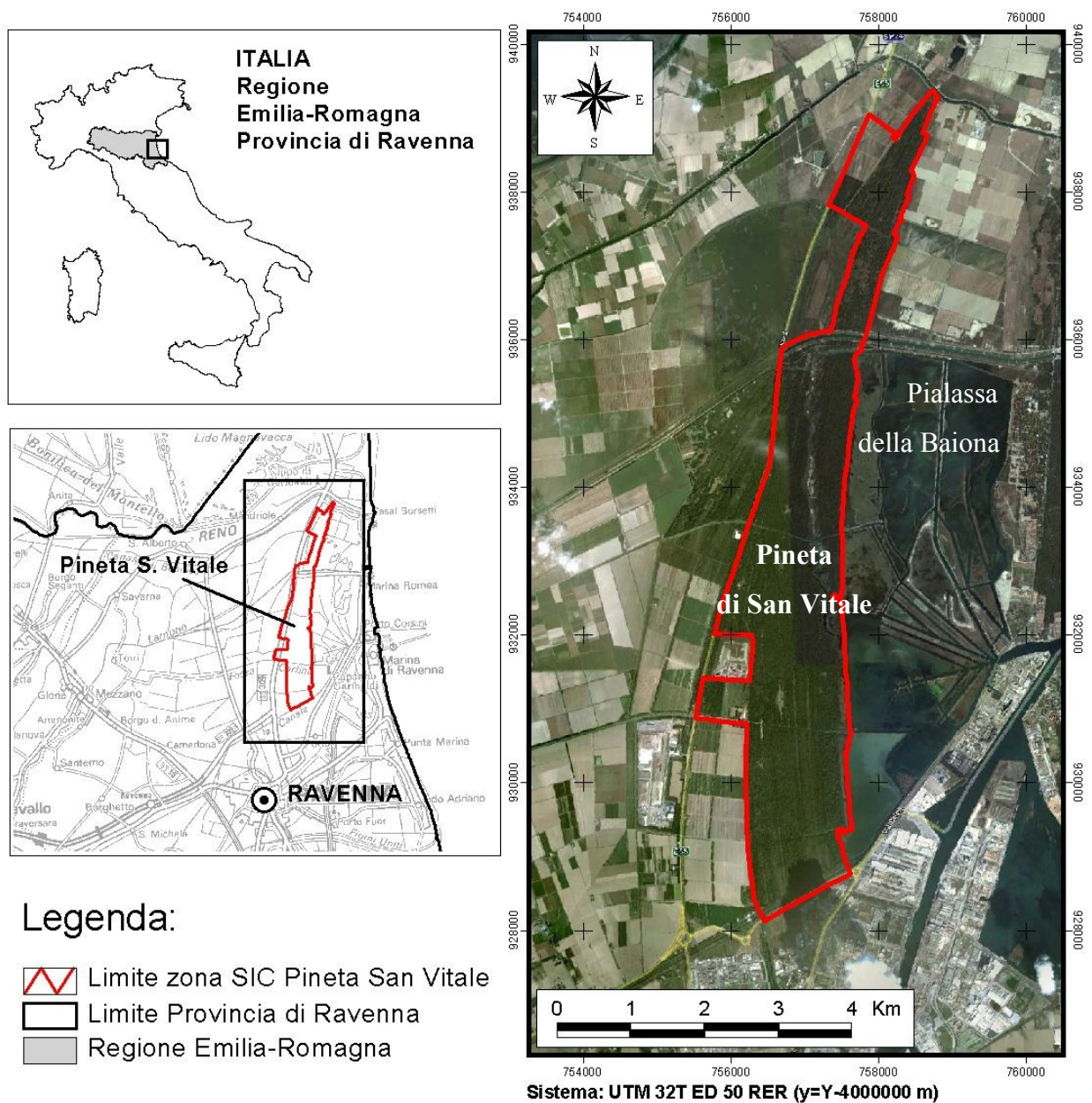
### **3 STUDIO SUI MICROARTROPODI EDAFICI DELLA PINETA DI SAN VITALE**

#### **3.1 La Pineta di San Vitale**

##### **3.1.1 Inquadramento geografico e origini storiche della Pineta**

L'area di studio ricade interamente all'interno dei confini della Pineta di San Vitale area SIC e ZPS, IT4070004 "Pialasse Baiona, Risega e Pontazzo" (Autorità dei Bacini Regionali Romagnoli, 2003).

La Pineta di San Vitale è situata a nord della città di Ravenna, lungo la fascia costiera delimitata a nord dall'ultimo tratto del Canale Destra Reno, poco prima dello sbocco in mare, e a sud dallo scolo Canala. Come si può osservare nella Fig. 3.1, il lato occidentale della pineta confina con la S.S. Romea mentre ad est è affacciata sull'area salmastra di circa 1.200 ettari costituita, procedendo da nord verso sud, dalla Pialassa Baiona, la maggiore, che si estende fra il Lamone e lo Scolo Fossatone, la Pialassa della Risega fra il Fossatone e lo Scolo Via Cerba, ed infine quella del Pontazzo che occupa la parte meridionale del territorio, sino allo Scolo Canala (Autorità dei Bacini Regionali Romagnoli, 2003).



*Fig. 3.1 Localizzazione della Pineta di San Vitale (Bacchi et al., 2011 modificato).*

Tutto il territorio della Pineta di S. Vitale, che presenta una superficie di circa 1312 ha sviluppata per una lunghezza pari a circa 11 km, è inserito all'interno del Parco Regionale del Delta del Po Emilia-Romagna, nella Stazione 4 "Pineta di San Vitale e Pialasse di Ravenna", come definito dai Piani Territoriali delle Stazioni del parco.

In particolare, il territorio in esame è classificato, in base al Piano Territoriale di Stazione adottato con C.C. 279/23841 del 14/05/1991, come Zona “Pre Parco”, ad eccezione di alcune aree limitrofe alla S.S. Romea.

Inoltre, tale territorio è sottoposto a vincolo idrogeologico forestale su R.D. 3267/23 ed è area SIC e ZPS (IT4070003 – “Pineta di San Vitale”, Direttive 79/409 e 92/43 CEE.

Le origini del territorio in esame sono da ricercare a partire dalla fine del Pliocene, circa 2 milioni di anni fa, quando al posto della Pianura Padana esisteva un bacino marino profondo tra i 150 e i 200 m chiamato “Golfo Padano”.

Nel corso del Quaternario, tale golfo è stato progressivamente riempito dai detriti trasportati dai corsi d’acqua superficiali, provenienti inizialmente solo dalle Alpi (Miocene) e successivamente anche dagli Appennini (Pleistocene).

Sotto l’azione del fenomeno della subsidenza, al crescente apporto di sedimenti è corrisposto un lento effetto di sprofondamento del fondo del golfo, che ha permesso il depositarsi di una spessa coltre di materiali fini, soprattutto argille e sabbie (Ricci Lucchi *et al.*, 1990; Pellegrini & Tellini, 2000).

Al termine del processo di riempimento del bacino, che ha portato alla formazione della pianura emersa dalle acque marine, i fiumi alpini e appenninici hanno continuato a trasportare materiale detritico formando sulla pianura una sottile copertura alluvionale dello spessore massimo di qualche centinaio di metri e, allo stesso tempo, confluendo e raccogliendosi tra loro, hanno dato origine al fiume Po (Cencini & Piastra, 2007).

Cordoni litorali derivanti dai materiali solidi trasportati verso il mare dai fiumi appenninici e dal Po hanno comportato ad un progressivo avanzamento della linea di costa negli ultimi 3000 anni come dimostrato dallo studio effettuato dal Ciabatti (1966).

Sempre secondo tale studio, la Pineta di San Vitale sorge su uno dei cordoni litorali più recenti formatosi attorno al 1600. (Fig 3.2).

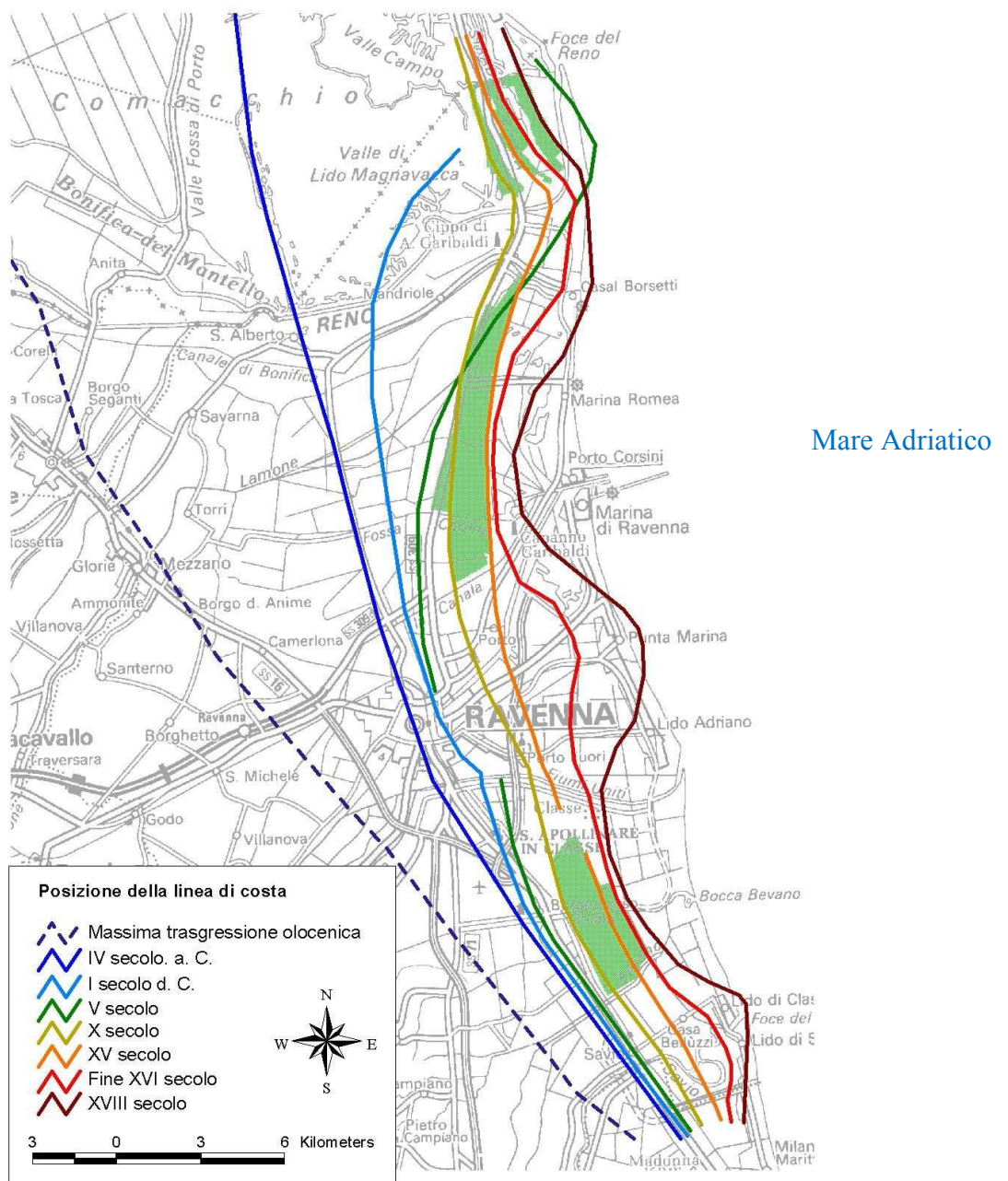


Fig 3.2 Evoluzione della linea di costa dalla massima trasgressione olocenica, sino al XVIII secolo così come ricostruibile sulla base di quanto riportato dalle diverse fonti bibliografiche: Veggiani, 1974; Bondesan, 1985; Bondesan et al., 1995.

Anche se si ritrovano testimonianze dell'opera dell'uomo già in età preistorica e nel periodo romano, gli effetti maggiori in termini di trasformazione del paesaggio



costiero Ravennate sono iniziati a partire dal XVIII secolo e soprattutto durante il XIX ed il XX secolo.

L'impianto delle Pinete odierne (nella Fig. 3.2 in verde chiaro) risale al XV secolo ad opera di comunità monastiche (Scossiroli, 1974). Già nel XVI secolo il litorale era caratterizzato dalla presenza di ampie zone boschive di proprietà degli arcivescovi di Ravenna che nel 1520 venivano concesse in enfiteusi alle quattro abbazie della città: S. Vitale, Classe, S. Giovanni e S. Maria in Porto. Ebbe così inizio un lungo e prospero dominio monastico delle Pinete accompagnato da un potenziamento di tutto il patrimonio boschivo (Fabbri e Missiroli, 1998).

Le Pinete storiche raggiunsero la loro massima ampiezza verso la fine del settecento quando si estendevano per 36 km ininterrottamente dal fiume Lamone sino a Cervia, coprendo una superficie allora valutata di 7417 ha (Zangheri, 1936). In questo periodo la coltura del pino forniva alla città di Ravenna una grande quantità di legname da opera, pigne per il riscaldamento, essenze resinose da usare in ambito farmacologico e in profumeria e, soprattutto, pinoli per uso alimentare.

Nel 1797 con l'invasione francese e la successiva soppressione delle corporazioni religiose, le abbazie persero definitivamente il controllo sulle pinete e la loro gestione passò alla Repubblica Cisalpina che, vendendole a privati, rese possibile lo sfruttamento, ma anche l'inizio degli abbattimenti. Ritornate sotto proprietà del Demanio Pontificio, nel 1836 ne fu affidata la gestione in comodato d'uso alle Canoniche Lateranensi le quali, a loro volta, le concedevano ad affittuari spesso per nulla interessati a garantirne la conservazione (Zangheri, 1936). Per tale cattiva gestione, nel corso del XIX secolo, si ebbero le maggiori distruzioni delle pinete.

Gli abbattimenti sono perdurati per diversi motivi sino agli anni '50 con la costruzione del polo chimico industriale ANIC, collocato ai lati del canale di porto, su terreni un tempo facenti parte della pineta (Cencini & Piastra, 2007). Tale opera, assieme al porto e alle industrie cresciute nelle vicinanze, furono determinanti per il deperimento della pineta, oltre a determinare l'inquinamento delle acque e dell'aria (Scossiroli, 1974).

L'evoluzione della pineta va poi inquadrata nel contesto della profonde trasformazioni del territorio limitrofo operate dall'uomo nel corso degli ultimi secoli come le opere di bonifica delle Valli Ravennati che sino al XVIII secolo si



estendevano per oltre 7000 ha nelle zone basse retrostanti alla Pineta di San Vitale. Tale bonifica, iniziata nel XVI secolo, si sviluppò in modo risolutivo nel corso del '800 facendo spagliare il Lamone in tale bacino. Il fiume fu poi ricondotto a mare dopo il 1960, praticando un taglio attraverso la Pineta San Vitale (Nardi, 1987).

Altro elemento di modifica riguarda le Pialasse, grandi lagune salmastre sviluppatasi a partire dal XVII secolo per progressiva occlusione di un braccio di mare in seguito alla costituzione di nuovi cordoni dunosi costieri (Roncuzzi, 1994), regimate idraulicamente sin dalla loro formazione.

Le Pialasse, (la cui origine etimologica significa “pia” e “lassa” cioè “prendi” e “lascia” riferito alle maree) tradizionalmente utilizzate dagli ingegneri idraulici veneziani a partire dal XVII secolo, consistevano in una particolare gestione del letto lagunare, creando una rete sommersa di canali finalizzata ad incrementare la capacità del flusso di marea di penetrare all'interno della laguna, aumentando sensibilmente il volume di acqua scambiata (Simeoni *et al.*, 2002). Le modifiche dell'assetto idraulico legate a questi ed altri interventi sono visibili oggi nel corso dei fiumi rettificato, nelle zone umide residue e nella fitta rete di canali scolanti che oggi attraversano le pinete.

### **3.1.2 Inquadramento pedologico della Pineta**

In base alla classificazione fornita dalla Carta dei Suoli della Regione Emilia-Romagna in scala 1:250000 (RER, 1994), la Pineta di San Vitale ricade nell'unità cartografica “1Dd” che comprende suoli della piana costiera, con idromorfia poco profonda, prevalente tessitura grossolana e bassa differenziazione del profilo.

In seguito alle trasformazioni precedentemente descritte (paragrafo 3.1.1), il territorio della Pineta di San Vitale è caratterizzato dall'alternanza di dune e depressioni interdunali ad andamento circa parallelo alla linea di costa, formati a partire da circa 1000 anni fa (Bondesan *et al.*, 1995; Scossiroli, 1974). Anche se con il passare dei secoli i dislivelli si sono progressivamente ridotti ed attenuati per l'apporto di materiali alluvionali ed eolici, sussistono ancora differenze di quota non superiori ai 3 m fra le sommità dunali dette “staggi” leggermente rilevate rispetto alle depressioni denominate “basse” ove l'acqua ristagna per periodi più o meno

prolungati o permanentemente come nel caso della bassa del Pirottolo. (Scossiroli, 1974).

Anche se dell'ordine di pochi metri, il sistema dunale è tale da influenzare in modo sostanziale la posizione della falda freatica rispetto alla superficie topografica: essa affiora nelle zone depresse mentre permane quasi sempre ad una profondità superiore a 1,5 m rispetto al piano campagna in corrispondenza dei dossi. Riguardo alla tessitura, il substrato pedogenetico si presenta generalmente grossolano, con aspetti più fini nelle depressioni. L'acqua di falda presenta gradi di salinità assai variabili nelle diverse aree della pineta (Buscaroli & Zannoni, 2006).

In base alla Carta dei Suoli di Pianura della Regione Emilia-Romagna in scala 1:50000, restituita su C.T.R. 1:25000, risulta che la pineta ricade interamente nella delineazione n. 118, situata in ambiente di piana di sabbia costituito da depositi di duna e da depositi di cordone all'interno della quale sono presenti tre pedotipi: suoli San Vitale, suoli Cerba e suoli Pirottolo.

Uno studio recente condotto da Buscaroli & Zannoni (2006) ha permesso di individuare la distribuzione e localizzazione dei pedotipi all'interno della Pineta, rappresentata in Fig. 3.3.



I suoli San Vitale, presenti in corrispondenza delle sommità dunali (Fig. 3.4), sono molto profondi, ben drenati, prevalentemente a tessitura sabbiosa fine, da non calcarei a scarsamente calcarei nella parte superiore, moderatamente o molto calcarei in quella inferiore. Il pH si presenta da debolmente a moderatamente alcalino, la sostanza organica è presente in aliquote abbastanza elevate, limitatamente agli orizzonti superficiali.

Il tipico profilo associato a questo tipo di suolo è composto, procedendo dall'alto verso il basso, dai seguenti orizzonti:

- orizzonte organico (O), caratterizzato dalla presenza di residui vegetali e animali;
- orizzonte organo-minerale (A), che contiene sostanza organica ed inorganica;
- orizzonte A/C di transizione tra l'orizzonte A e l'orizzonte C;
- substrato pedogenetico (C), materiale da cui si è originato il suolo;
- substrato pedogenetico a gley (Cg), con fenomeni di ossidoriduzione intensi associati all'influenza della vicina falda freatica.

Generalmente la falda risulta presente oltre i 150 cm di profondità.

Dal punto di vista tassonomico tali suoli sono classificati come *Calcaric Arenosols* in base al WRB, World Reference Base for Soil Resources (IUSS Working Group, 2006) e come *Typic Ustipsamments* secondo la Soil Taxonomy (SSS, 2010).

I suoli Cerba sono generalmente presenti nelle zone morfologicamente intermedie tra bassure e sommità dunali. Sono prevalentemente a tessitura sabbiosa e risentono in diversa misura dell'influsso di falda. Il pH si presenta neutro in superficie e tende a divenire alcalino con la profondità. La sostanza organica è presente limitatamente agli orizzonti superficiali. Generalmente presentano screziature bruno grigiastre tra 50 e 80 cm di profondità. Sono classificati come *Calcaric Arenosols (Gleyic)* in base al WRB e come *Aquic Ustipsamments* secondo Soil Taxonomy.

I suoli Pirottolo si rinvencono nelle zone di bassura con falda superficiale da semiaffiorante ad affiorante in alcuni periodi dell'anno (Fig. 3.4). Sono tipicamente da molto scarsamente a moderatamente calcarei con pH neutro in superficie per divenire più alcalino con l'aumentare della profondità; da non salini a moderatamente salini; a tessitura sabbiosa fine franca o franca sabbiosa fine. Il contenuto di materia organica risulta notevole in superficie e tende gradualmente a diminuire passando agli orizzonti

profondi. Possono presentare screziature bruno grigiastre già nei primi orizzonti per via dei meccanismi di ossidazione-riduzione del Fe indotti dall'oscillazione della falda.

Data la vicinanza della falda freatica alla superficie, rispetto ai due precedenti tipi di suolo, lo spessore dei diversi orizzonti risulta ulteriormente ridotto; il profilo tipico dei suoli Pirottolo vede una lettiera O di spessore centimetrico, giustapposta ad un orizzonte organo-minerale A. Al di sotto si evidenzia direttamente un orizzonte Cg influenzato dalla presenza della falda freatica. Questi infatti, sono suoli con proprietà gleyiche (intensi fenomeni di ossido-riduzione), che si presentano entro 50 cm dalla superficie. A livello di classificazione questi suoli sono definiti come *Calcaric Gleyic Arenosols* in base al WRB e come *Typic Psammaquents*, secondo la Soil Taxonomy.

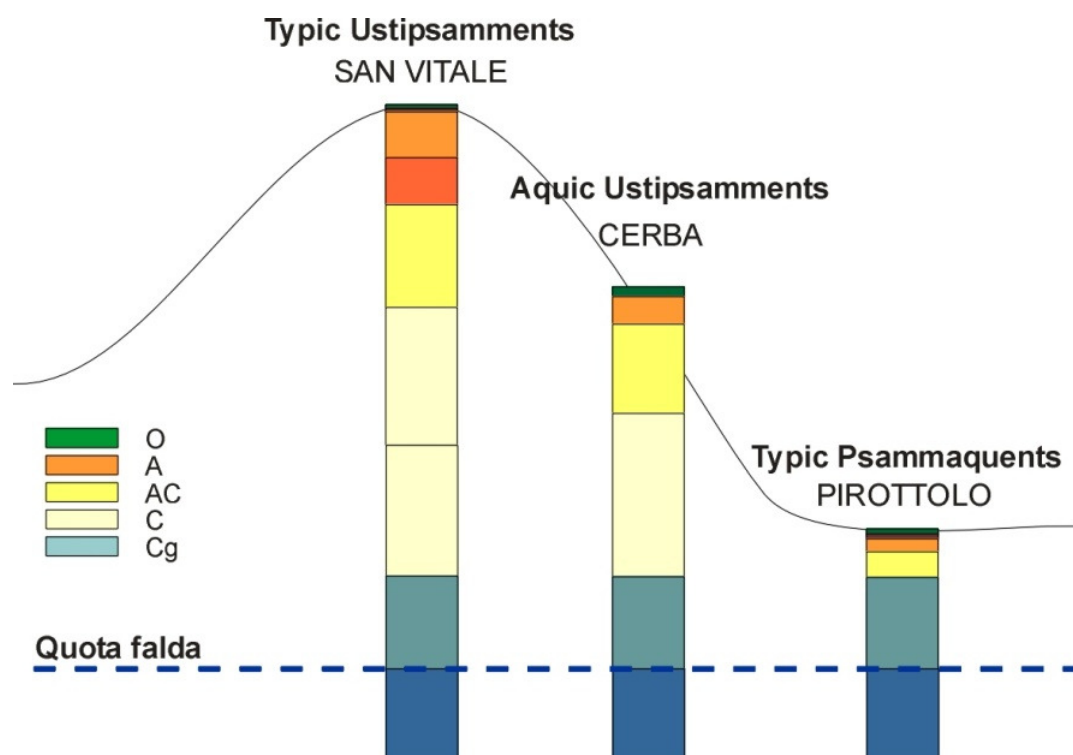


Fig. 3.4 Morfosequenza delle tipologie di suoli presenti nella Pineta di San Vitale, come indicate dalla Regione Emilia-Romagna (da Buscaroli & Zannoni, 2006).

In linea con gli obbiettivi del presente lavoro, particolare attenzione è stata posta ai valori relativi alla salinità nei diversi pedotipi all'interno della pineta.

Da uno studio condotto da Buscaroli *et al.* (2007), relativo ai suoli e alla vegetazione della Pineta di San Vitale, emerge che in generale i suoli Pirottolo presentano un tenore medio di salinità decisamente maggiore che non negli altri due pedotipi, così come maggiore è la variazione della salinità, soprattutto nei primi 10 cm di profondità.

A volte si registra un aumento di salinità procedendo in profondità nel profilo, legato principalmente alla presenza di falda salmastra. Di contro, durante i periodi estivi, siccitosi, si registra sovente un incremento di salinità alla superficie del suolo. Tale incremento risulta tanto più evidente quanto più prossima alla superficie risulta essere la tavola d'acqua, e quanto maggiore è la sua salinità (Buscaroli e Zannoni, 2010). Oltre a ciò, è verosimile ipotizzare un contributo alla salinizzazione superficiale, conseguente alla deposizione di aerosol marino. Buscaroli *et al.* (2007) mettono in relazione, inoltre, i pedotipi presenti con la vegetazione osservata (Fig. 3.5).

Dallo studio risulta che i suoli San Vitale sono dominati da tipi di vegetazione xerofila e termofila, il cui principale rappresentante è costituito da *Pinus pinea*. A livello arboreo, trovano posto anche *Quercus pubescens* e *Quercus robur*, quest'ultimo sempre presente ma in modo rado, *Quercus ilex* e *Fraxinus ornus*. Tra le specie arbustive, si ritrovano *Phyllirea angustifolia*, *Clematis flammula*, *Osyris alba*, *Teucrium chamaedrys* e *Colutea arborescens*, frammiste alla vegetazione arborea o a formare comunità arbustive vere e proprie, in situazioni pre-forestali o come sintomo di una situazione di degradazione del bosco.

Per i suoli Cerba, caratterizzati da un *range* di profondità della falda piuttosto ampio, si possono individuare comunità vegetali associabili a suoli Cerba profondi (profondità della falda variabile da circa 80 cm a 150 cm di profondità) e suoli Cerba superficiali (profondità della falda variabile da circa 50 cm a 80 cm di profondità). I primi presentano un'elevata copertura a *Quercus robur*, mescolata anche ad alcuni esemplari di *Pinus pinea*; vi sono poi alcune specie indicatrici quali *Viola hirta* e *Buglossoides purpureocaerulea*. I suoli Cerba superficiali, data la vicinanza della falda freatica, presentano invece molte specie caratteristiche dei boschi igrofili, quali *Fraxinus oxycarpa*, *Populus alba* e *Ulmus minor*, mentre *Quercus robur* è ridotto a pochi individui o addirittura non presente. Nelle zone a maggiore copertura arborea, si

Infine, ai suoli Pirottolo sono associate comunità vegetali determinate dalla vicinanza della falda freatica alla superficie e dalla sua salinità. In tal modo si individuano suoli Pirottolo non salini, che presentano tutte specie tipiche dei boschi igrofili: *Ulmus minor*, a livello arboreo, *Prunus spinosa* e *Solanum dulcamara*, a livello arbustivo, sino al canneto dominato da *Phragmites australis*.

**SAN VITALE**  
Arboree

- Pinus pinea*
- Quercus ilex*
- Quercus pubescens*
- Quercus robur* (rado)
- Fraxinus ornus*

Arbustive

- Phyllirea angustifolia*
- Clematis flammula*
- Osyris alba*
- Teucrium chamaedrys*
- Colutea arborescens*

**CERBA PROFONDI**  
Arboree

- Pinus pinea* (rado)
- Quercus robur* (denso)

Erbacee perenni

- Viola hirta*
- Buglossoides purpureo-caerulea*

**CERBA SUPERFICIALI**  
Arboree

- Quercus robur* (rado)
- Fraxinus oxycarpa*
- Populus alba*
- Ulmus minor*

Arbustive

- Viburnum opulus*
- Solanum dulcamara*
- Frangula alnus*
- Prunus spinosa*

Erbacee perenni

- Alisma lanceolatum*

**PIROTTOLLO NON SALINO**  
Arboree

- Ulmus minor*

Arbustive

- Prunus spinosa*
- Solanum dulcamara*

Erbacee perenni

- Phragmites australis*

**PIROTTOLLO SALINO**  
Cespugliose perenni

- Juncus maritimus*

Sufruticose perenni

- Salicornia gr. europaea*

Quota falda

67

### **3.1.3 Studio sui microartropodi edafici**

Sebbene sia molto difficile eseguire un paragone su ciò che si è ottenuto in questo lavoro con lo studio effettuato da Scossiroli (1974) sulla pedofauna della Pineta di San Vitale, sia per le metodica di campionamento utilizzate che per le modalità di analisi dei dati sperimentali, è possibile comunque effettuare qualche osservazione a livello generale. Si deve inoltre tener presente che gli obiettivi degli studi sono anche essi diversi: lo studio di Scossiroli fu eseguito al fine di valutare gli effetti sulla pedofauna dell'inquinamento provocato dagli insediamenti industriali limitrofi alla Pineta di San Vitale e quindi l'area di campionamento maggiormente considerata fu quella Sud-Ovest. Nel presente lavoro, invece, si è cercato di considerare il più ampiamente possibile la Pineta soprattutto in seguito a studi recenti in cui si afferma che esiste il fenomeno della salinizzazione per effetto del cuneo salino. Pertanto si sono monitorate la zona Est e la zona Ovest e valutate le eventuali ripercussioni della falda freatica salinizzata sulla pedofauna.

A livello generale, si può comunque affermare che in entrambi i lavori la componente biologica del suolo è dominata da Acari e Collemboli, che presentano una distribuzione aggregata, di tipo contagioso.

Le variazioni sistematiche riscontrate all'interno di questi due gruppi, nonostante siano state reperite numerose specie per entrambi nel lavoro di Scossiroli, solo poche si sono dimostrate predominanti. Questa caratteristica è stata correlata al peggioramento delle condizioni ambientali della zona, dovute all'inquinamento atmosferico provocato dagli impianti industriali presenti vicino al confine meridionale della Pineta.

Dal punto di vista quantitativo, sebbene non ci siano prove determinanti, è stata rilevata una maggiore tendenza a subire notevoli variazioni nella frequenza media degli Acari rispetto ai Collemboli. Tali fluttuazioni numeriche sono state certamente dovute a diversi fattori dipendenti sia dal tempo di prelievo, come ad esempio variazioni del ciclo riproduttivo delle specie appartenenti ai due gruppi, sia dalla



collocazione e relative condizioni di microambiente (caratteristiche chimico-fisiche del suolo, livello della falda, tipo di copertura vegetale e quindi tipo di lettiera, ecc.).

In generale, lo studio degli indici di diversità ha evidenziato una condizione di disagio per alcune comunità di organismi confermando sicuramente effetti negativi sull'ecosistema della Pineta associati all'inquinamento atmosferico da scarichi industriali, sebbene non sia in grado di rilevare un effetto apprezzabile. La ricerca ecologica svolta ha sottolineato un'influenza limitata e comunque localizzata delle ricadute di inquinanti dall'atmosfera, dovute alla presenza degli impianti industriali.

Sempre nel lavoro di Scossioli, molto più rilevanti invece sembrano essere le caratteristiche del sottosuolo ed in particolare gli effetti dell'inquinamento della falda freatica dovuta a cloruri e a solfati.

Gli acari, infatti, rispetto ai collemboli, risultano presenti in minor numero nelle posizioni estreme del transetto Sud-Nord, ma particolarmente nelle stazioni più meridionali come già detto maggiormente interessate dall'inquinamento. Nel presente studio, invece, si ricorda che non sono stati valutati gli inquinanti in falda freatica ma solamente la conduttività elettrica e quindi gli effetti su una eventuale presenza di salinità. In questo studio non emerge un gradiente Sud-Nord per quello che riguarda l'abbondanza di acari rispetto ai collemboli.

Sempre in Scossioli, il periodo di campionamento ha riguardato un ampio intervallo di tempo (da giugno a dicembre) e nelle analisi eseguite è stata considerata anche la variazione nel tempo dell'indice di diversità. Emerge da tale analisi che l'indice presenta un'uniforme riduzione in tutte le stazioni per cui la stagione estiva e le autunno invernali appaiono come fattori condizionanti lo sviluppo qualitativo e quantitativo della comunità della pedofauna. Quest'ultima affermazione è in contrasto con lo studio qui presentato, dove dal campionamento primaverile a quello estivo è emerso un aumento sia a livello quantitativo che di biodiversità della pedofauna. Ciò emerge anche, sempre nel presente studio, dalle classi di qualità del suolo che passano da buone ad ottime dalla primavera all'estate.

### **3.1.4 Il problema della salinizzazione nella Pineta di S. Vitale**

In base allo studio effettuato da Giambastiani (2006) inserito all'interno di un lavoro più ampio relativo all'intrusione di acqua marina nell'acquifero della costa meridionale della Pianura Padana (Antonellini *et al.*, 2008), grazie al quale è avvenuta la ricostruzione delle carte stagionali delle isoaline tra l'autunno 2004 e l'estate 2005 (Fig. 3.6), emerge che la Pineta di San Vitale è soggetta in parte a problemi di salinizzazione dell'acquifero. Le cause di tale fenomeno sono molteplici e riconducibili sia a fattori naturali che antropici.

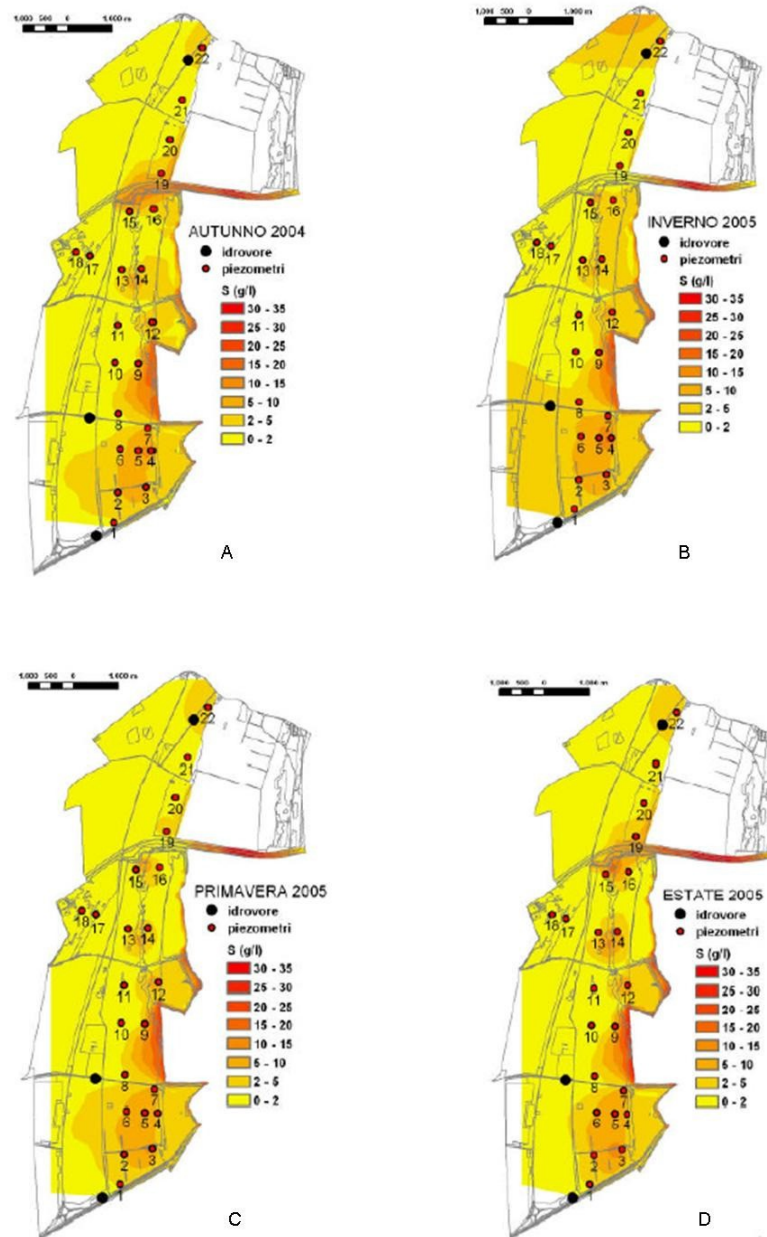


Fig. 3.6. Carte della distribuzione della salinità misurata alla superficiale della falda nei periodi autunnale (A), invernale (B), primaverile (C) ed estivo (D) (da Giambastiani, 2006).

Innanzitutto, il territorio in esame presenta alcune aree che per loro natura sono a quote di poco superiori o addirittura inferiori al livello marino, e pertanto è favorita l'ingressione di acqua marina sia nell'acquifero che a livello delle acque superficiali (Antonellini *et al.*, 2008).

Allo stesso tempo, dal 1950 si osserva un progressivo abbassamento del livello del suolo nell'area costiera in associazione a fattori quali la subsidenza, l'erosione costiera e la riduzione se non la mancanza di apporti di sedimenti alluvionali (APAT, 2002).

Pertanto, il territorio presenta una topografia che determina un'altezza del livello piezometrico insufficiente a contrastare l'ingressione salina, in base al principio di Ghyben-Herzberg che descrive la posizione dell'interfaccia tra acqua dolce e acqua salata per un acquifero costiero in condizioni di flusso stazionario (Antonellini *et al.*, 2008).

Il fenomeno dell'intrusione salina avviene quando l'acqua salata, più densa, viene richiamata dal mare negli acquiferi costieri. Ciò avviene se si abbassa il livello della falda di acqua dolce, oppure se si innalza il livello medio del mare. In entrambi i casi, diminuisce l'altezza della falda al di sopra del livello del mare e conseguentemente anche quella al di sotto del livello del mare: l'acqua salata sale di quota e si muove verso l'entroterra. La superficie di separazione tra acqua dolce e salata assume una tipica forma a cuneo, da cui il termine cuneo salino (Fig. 3.7).

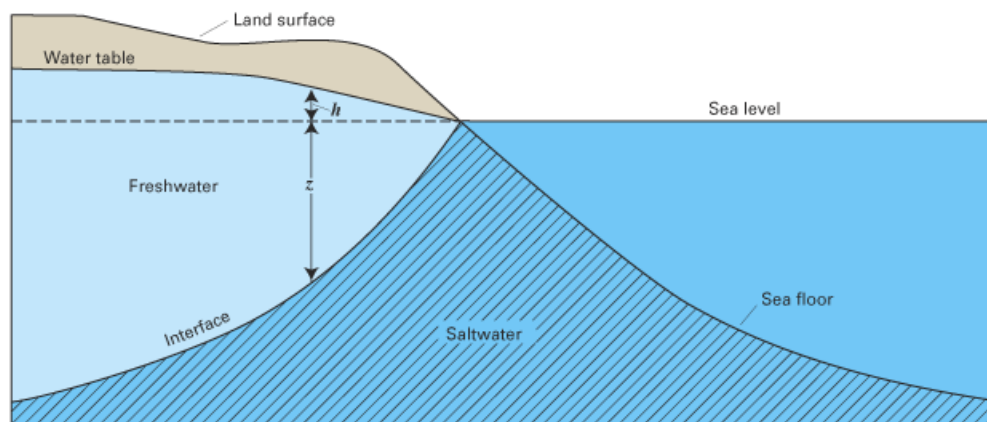


Fig 3.7. Relazione di Ghyben-Herzberg per un acquifero freatico costiero (da Wikipedia [http://it.wikipedia.org/wiki/Cuneo\\_salino](http://it.wikipedia.org/wiki/Cuneo_salino))

Un ulteriore aspetto che favorisce l'intrusione salina è quello relativo alla limitata ricarica dell'acquifero costiero, sia per le scarse precipitazioni che per le relative alte temperature che si verificano soprattutto nel periodo estivo. Per quanto riguarda l'aspetto climatico si è fatto riferimento ai dati relativi alla stazione termo-pluviometrica dell'Azienda Agraria Sperimentale Mario Marani (3 m.s.l.m.), della Regione Emilia-Romagna (Fig. 3.8).

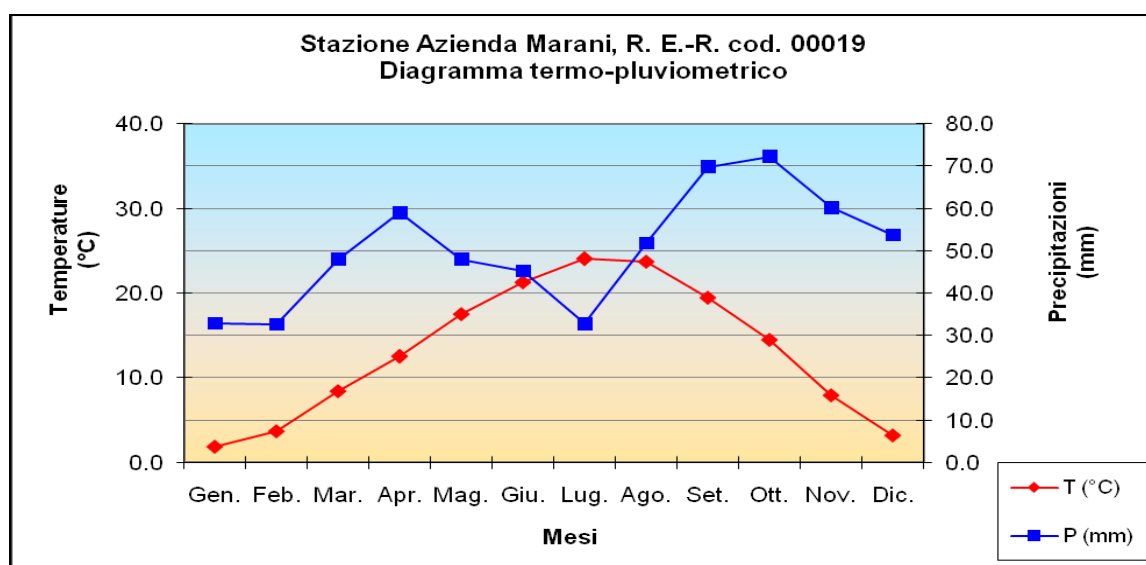


Fig. 3.8 Diagramma termo-pluviometrico. Valori ottenuti dall'analisi delle precipitazioni totali mensili e delle temperature medie mensili registrate nel periodo 1981 – 2010, presso la stazione termo-pluviometrica dell'Azienda Sperimentale "M. Marani" (Coordinate Geografiche Ed 50: 44°27' N, 12°12' E - Quota 3 m slm).

La stazione si colloca a nord di Ravenna, poco ad ovest della Pineta San Vitale, in posizione pertanto ottimale per rappresentare i profili indagati. I dati utilizzati, relativi alla distribuzione delle precipitazioni totali mensili ed all'andamento delle temperature medie mensili, sono relativi ad un arco temporale di 30 anni (1981 – 2010). Come è possibile notare un primo massimo di precipitazioni si registra nel mese di ottobre (media annua di 72,2 mm) mentre un secondo massimo si registra nel mese di aprile (media annua di 58,9 mm). Le precipitazioni totali annue ammontano a 606,2 mm. Relativamente alle temperature, il massimo si registra nel mese di luglio (media 24,0 °C) mentre il mese più freddo risulta essere gennaio, con una temperatura media di 1,9 °C. La temperatura media annua risulta essere pari a 13,2 °C. In pineta,

inoltre, si osservano tassi di evapotraspirazione elevati, la ricarica dell'acquifero corrisponde a soli 14 mm/anno (Antonellini *et al.*, 2008). Infine, il territorio ravennate negli ultimi quarant'anni è stato caratterizzato da vistosi e preoccupanti fenomeni di subsidenza, ovvero di abbassamento del suolo, con gravi ripercussioni sull'equilibrio ambientale.

I fattori che tuttavia a partire dagli anni '50 hanno determinato l'inequivocabile aumento dei tassi di subsidenza sono stati lo sfruttamento dei bacini metaniferi, e l'intenso emungimento di acque dal sottosuolo dettati rispettivamente dallo sviluppo del polo industriale di Ravenna e da un modello di agricoltura fortemente idroesigente.

Nel corso degli anni sono stati diversi gli studi che hanno interessato la Pineta di San Vitale, per quanto riguarda aspetti vegetazionali e pedologici. Al riguardo di questi ultimi, Zangheri (1936) produsse una prima ricerca documentata sui suoli della pineta, a cui hanno fatto seguito ulteriori studi condotti da Sandri ed altri autori nel 1956, 1970 e 1974 all'interno di progetti a carattere multidisciplinare. Il problema di questi interessanti lavori risiede nella mancanza di una localizzazione esatta dei siti di campionamento che ne rende problematico il confronto con osservazioni condotte in periodi successivi.

A partire dal 1988, sono state realizzate campagne di rilevamento pedologico effettuate con criteri di maggiore oggettività, che hanno contribuito alla realizzazione della banca dati dei suoli regionali (Piazzi, 1988; RER, 1994 e 1999).

In un lavoro recente, Zannoni (2006), l'autore ha realizzato, nonostante le difficoltà oggettive, un lavoro di sintesi dei dati pedologici disponibili, riconducendo le osservazioni storiche effettuate ai pedotipi descritti dalla RER (San Vitale, Cerba e Pirottolo), basandosi in questo su indicazioni relative alla stazione di campionamento (morfologia, vegetazione, profondità di falda).

A tal riguardo, in Tab. 3.1 si osserva come dal rilievo del 1986-88 i suoli San Vitale e Cerba non risultino salini mentre i pedotipi Pirottolo possano essere inquadrati come salini, sulla base delle indicazioni dell'US Salinity Laboratory Staff (1954).

*Tab. 3.1. Valori medi di conduttività elettrica per tipologia di suolo, elaborati a partire dai parametri analizzati da Piazzì (1988), modificato.*

Suoli	C.E. (dS/m)
San Vitale	0.90
Cerba	2.00
Pirottolo	6.18

Analizzando i dati pregressi si ha conferma che essi forniscono valori sostanzialmente indicativi e che quindi non possano essere utilizzati per stimare dei trend nel tempo.

L'incremento della salinità negli orizzonti superficiali di alcuni profili (specie nei suoli Pirottolo) è probabilmente riconducibile ad evapotraspirazione (risalita capillare di acqua) ma anche a deposizioni di aerosol marino. Solo studi recenti (Zannoni, 2008; Buscaroli e Zannoni 2010) hanno permesso di stabilire una relazione molto stretta tra condizioni meteorologiche, in particolare temperatura e precipitazioni Fig. 3.1, con la fluttuazione dell'acqua di falda e la salinizzazione del suolo Tab. 3.2 e Tab. 3.3.

Studi condotti da Álvarez-Rogel *et al.* (1997, 2001, 2007) evidenziano infatti come l'andamento del regime termopluviometrico influisca fortemente sui parametri della salinità nei suoli di ambienti dunali costieri.

Nei suoli delle zone topograficamente più elevate la falda si colloca ad una profondità tale da influenzare le caratteristiche solamente degli orizzonti profondi (oltre 1 m di profondità) non esercitando effetti in superficie. Nelle depressioni interdunali, dove la tavola d'acqua si trova a profondità inferiori, questa è in grado di influenzare in maniera significativa le caratteristiche degli orizzonti superficiali dei suoli. Nei suoli Pirottolo in particolare, anche grazie alla tessitura più fine, si ha una maggiore risalita capillare e la conseguente deposizione di sali in superficie (Tab. 3.2). Cosa questa, che avviene con intensità sicuramente inferiori nei pedotipi San Vitale e

Cerba, probabilmente anche a causa della tessitura sostanzialmente sabbiosa lungo gli interi profili, caratteristica che non agevola la risalita capillare (Tab. 3.3).

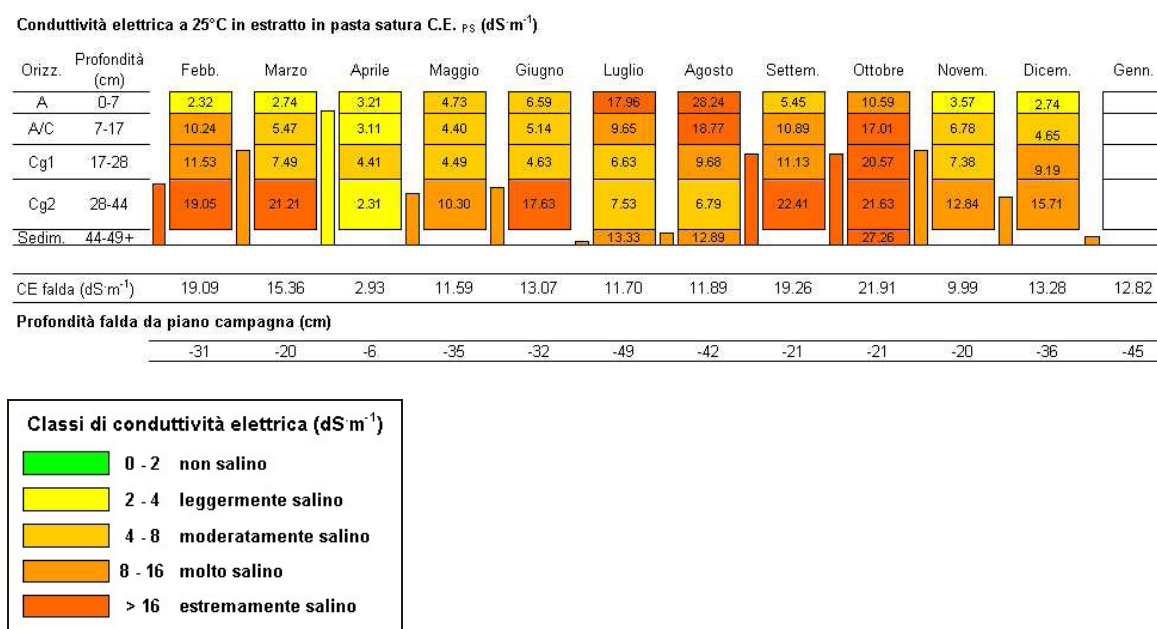
Come è possibile vedere in Tab. 3.2, nei campionamenti di febbraio e marzo i valori molto alti di CE in falda si riflettono sui valori di CE negli orizzonti più profondi, mettendo in evidenza il trend di aumento sopra indicato. Le ingenti piovosità precedenti il campionamento di aprile hanno portato anche qui ad una generale diminuzione della CE lungo tutto il profilo (valori leggermente alti) che si è riflesso sulla CE di falda, scendendo anch'essa ai medesimi valori. Nei mesi di maggio e giugno si osserva di nuovo una ulteriore salinizzazione della falda (valori molto elevati di CE) che si ripercuote sul profilo andando a ricreare il trend di aumento verso la profondità. Nei mesi di luglio e agosto, l'elevata temperatura ed il perdurare di scarsa piovosità inducono forti accumuli di sali in superficie, portando la CE del suolo a valori estremamente alti. Gli eventi piovosi di settembre portano ad una migrazione dei sali dalla superficie alla profondità.

Non è visibile una migrazione di sali in superficie in ottobre, ma il persistere di valori estremamente alti di CE in falda, forse legati ad intrusione marina, porta a valori di CE del suolo altrettanto alti in tutti gli orizzonti ad eccezione del più superficiale. Le precipitazioni di novembre inducono ad una lisciviazione dei sali dal profilo portando ad un abbassamento generalizzato della CE del suolo e della CE di falda, anche se il trend di aumento verso la profondità permane. Condizioni non molto diverse sono poi state riscontrate in dicembre. È da osservare come le diminuzioni di CE in falda sembrano essere legate non solo all'effetto diluente delle precipitazioni, ma anche all'accumulo dei sali in superficie nei mesi di luglio e agosto.

Gli aumenti di CE del suolo in superficie tipici di suoli in bassure interdunali durante i periodi estivi risulta in linea con quanto riscontrato anche da Álvarez-Rogelet *al.* (1997, 2001, 2007).



Tab. 3.2. Andamento della conduttività elettrica negli orizzonti del profilo di un suolo Pirottolo (zona Est) e nelle acque di falda anno 2007 (Tratto da Buscaroli e Zannoni, 2010).



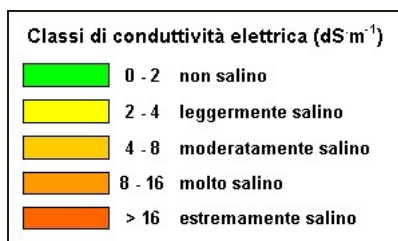
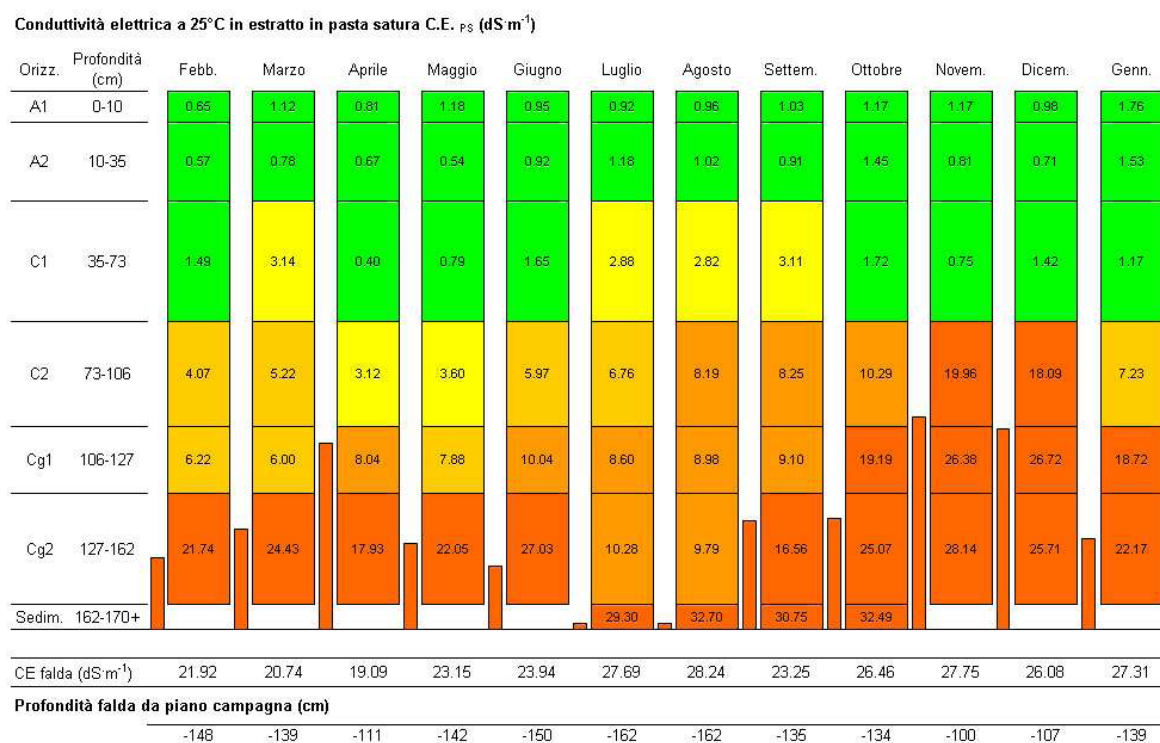
In Tab. 3.3 viene riportato il grafico relativo all'andamento della CE in un profilo di suolo San Vitale. In generale, la CE negli orizzonti aumenta con la profondità, approssimando quella di falda in prossimità della tavola d'acqua (valori estremamente alti). Nei mesi di giugno, luglio e agosto si assiste ad una progressiva diminuzione del livello della falda, e ad un incremento della sua CE (oltre 28 dS/m in agosto).

In tale periodo i valori di CE negli orizzonti di substrato, pur presentando un trend di aumento verso il basso, subiscono inizialmente una lieve flessione (luglio) per l'effetto di allontanamento dalla falda. Nel mese di agosto, invece, le alte temperature rendono predominante l'effetto di risalita capillare di acqua e si osserva un aumento della CE che si attesta a valori molto alti sino all'orizzonte C2. I valori molto alti di CE negli orizzonti C2 e Cg1 permangono anche in settembre. Nei successivi mesi autunnali e di dicembre si assiste ad un progressivo innalzamento della falda sino ad 1 m dal p.c., la quale trasmette i suoi valori estremamente alti di CE al suolo sino all'orizzonte C2.

Dagli andamenti complessivi si può osservare come le precipitazioni influenzino il livello della falda freatica, ma anche come l'effetto diluente di queste sulla salinità

della falda nel San Vitale sia pressoché irrilevante, segno evidente che la salinità derivi per intrusione del cuneo salino dagli orizzonti sottostanti.

*Tab. 3.3. Andamento della conduttività elettrica negli orizzonti del profilo di un suolo San Vitale (zona Est) e nelle acque di falda anno 2007. (Tratto da Buscaroli e Zannoni, 2010).*



## **3.2 Materiali e Metodi**

### **3.2.1 Disegno di campionamento**

Il disegno di campionamento è stato messo a punto utilizzando la Carta dei suoli della Pineta di San Vitale in scala 1:20000 (Buscaroli & Zannoni, 2006) per ottenere un'indicazione sulla distribuzione dei tre tipi di suolo e le carte “Surface salinity map, autumn 2004” e “Surface salinity map, spring 2005” (Antonellini *et al.*, 2008), per definire i periodi di campionamento.

Inoltre, sono state utilizzate delle immagini satellitari della zona (Google Earth) inserite nel sistema WGS84, coordinate UTM 33.

I sopralluoghi preliminari e definitivi sono stati eseguiti utilizzando un ricevitore GPS che ha permesso di identificare in maniera puntuale i siti di osservazione e campionamento.

L'area di studio, in cui sono stati individuati i siti di campionamento è costituita dall'intera Pineta S. Vitale, ad esclusione del lembo più settentrionale, separato dal resto della pineta dal fiume Lamone. L'area è stata suddivisa in due zone: zona Est, più verso il mare, caratterizzata, secondo gli studi precedenti già citati (Giambastiani, 2006), da valori di salinità maggiori nel suolo, nell'acqua superficiale e nell'acqua di falda, e zona ovest, più interna, con salinità più basse. Sempre secondo le informazioni disponibili, la differenza di salinità è accentuata nel periodo estivo e si riduce di molto nelle altre stagioni. All'interno di tali zone sono stati definiti sei transetti, in modo tale da avere una copertura il più possibile rappresentativa e complessiva dell'intera pineta. I transetti, tre per ogni zona, sono stati collocati uno a nord, uno al centro e uno a sud all'interno delle stesse, ovvero, procedendo da nord verso sud, transetti 4, 5, 6 nella zona est e transetti 3, 2, 1 nella zona ovest (Fig. 3.9).



*Fig 3.9 Posizione dei transetti di campionamento all'interno della Pineta di San Vitale (Google Earth, modificata).*

Ogni transetto corrisponde ad una linea immaginaria che unisce due punti: il primo punto è rappresentato dalla sommità di una paleoduna; il secondo, a quota inferiore, è posto sul fondo di una attigua depressione interdunale.

Per questo motivo, l'andamento dei transetti è risultato essere in direzione ovest-est con orientamento circa perpendicolare rispetto alla linea di costa, sebbene spesso non perfettamente lineare.

Inoltre, la scelta dei transetti è stata effettuata in modo che ci fosse una chiara differenza di elevazione tra i due punti estremi e che la pendenza tra questi variasse in modo abbastanza regolare, senza incorrere in contropendenze e depressioni o sommità secondarie. Per quanto possibile si è anche evitato che la linea del transetto attraversasse uno dei numerosi sentieri e carrarecce che percorrono la pineta.

Come conseguenza di tali intenzioni, la lunghezza dei transetti è risultata essere piuttosto variabile, compresa tra un minimo di 19 m ed un massimo di 71 m (Tab. 3.1).

Un'altra conseguenza, associata alle suddette considerazioni ma legata anche alla necessità di arrivare in prossimità dei punti di campionamento con gli automezzi, è stata quella di ottenere l'allineamento tra coppie di transetti posizionati all'interno di ciascuna zona, a nord, centro e sud delle stesse (Fig. 3.10).

Dopo aver individuato i transetti, all'interno di ciascuno di questi, sono state definite tre stazioni di campionamento in relazione ai tre tipi di suolo; due posizionate agli estremi dello stesso, in corrispondenza della sommità della duna (suolo San Vitale) e della depressione interdunale (suolo Pirottolo), ed una in posizione intermedia, in corrispondenza del suolo Cerba.

All'interno di ciascun transetto, l'orientamento dei tre tipi di suolo non è risultato essere sempre lo stesso: in alcuni casi la stazione Pirottolo è a est della rispettiva stazione San Vitale, quindi il Pirottolo è più vicino alla Pialassa; in altri casi accade il contrario, con la stazione San Vitale a minore distanza dalla Pialassa rispetto alle altre due stazioni.

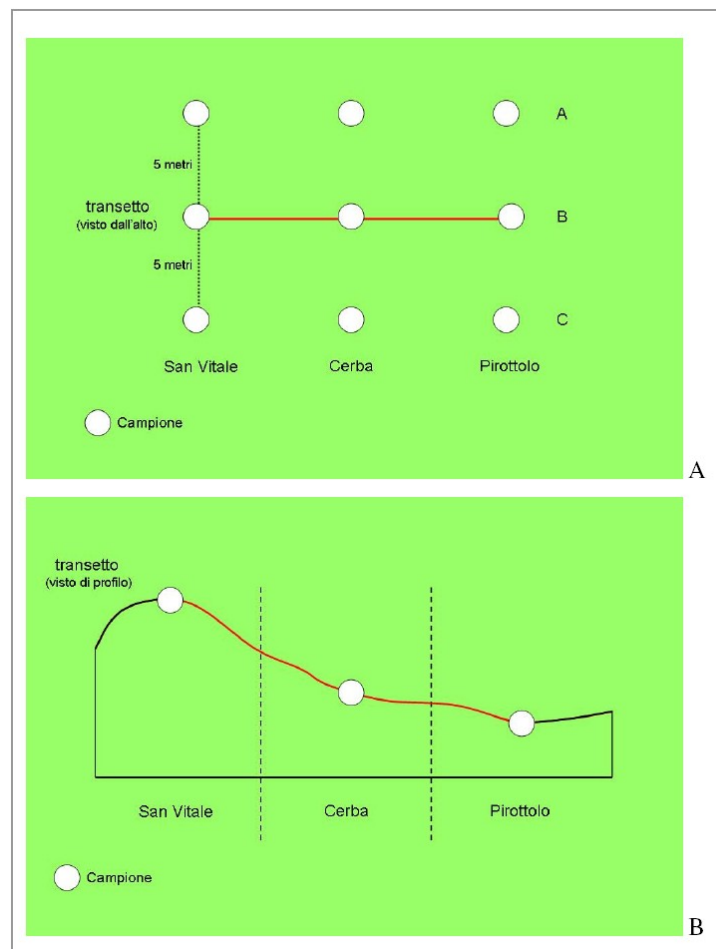
Come mostrato nella Fig. 3.10, in ognuna delle tre stazioni (San Vitale, Cerba e Pirottolo) sono stati posizionati tre punti di prelievo disposti lungo la perpendicolare rispetto alla linea del transetto, garantita attraverso l'eventuale rimozione di porzioni di vegetazione motivo d'intralcio. In corrispondenza di ogni punto è stato prelevato un campione di suolo, in modo da avere un punto di prelievo centrale (B) in corrispondenza della linea del transetto e due punti di prelievo laterali (A, C). Questi

ultimi sono stati posizionati alla distanza di 5 m da quello centrale, distanza determinata tramite l'ausilio di una cordella metrica.

Particolare attenzione è stata posta alle stazioni di campionamento, infatti, queste dovevano essere il più possibile inalterate, non sottoposte a calpestio. Si è anche evitato di disturbare i punti di raccolta dei campioni durante il posizionamento e durante le operazioni necessarie a rendere raggiungibili le posizioni scelte.

*Tab.3.1 Tabella riassuntiva delle principali caratteristiche dei transetti e delle stazioni di campionamento.*

Zona	Transetto	Lunghezza	Stazione	Coordinata WGS 84 – UTM 33	
				Est (m)	Nord (m)
Ovest	1 (sud)	19	San Vitale	279031	4928381
			Cerba	279040	4928379
			Pirottolo	279049	4928375
	2 (centro)	22	San Vitale	279529	4931804
			Cerba	279539	4931804
			Pirottolo	279552	4931802
	3 (nord)	49	San Vitale	279967	4933910
			Cerba	279920	4933921
			Pirottolo	279955	4933910
Est	4 (nord)	36	San Vitale	280823	4933753
			Cerba	280795	4933756
			Pirottolo	280788	4933761
	5 (centro)	71	San Vitale	280383	4931687
			Cerba	280413	4931685
			Pirottolo	280345	4931704
	6 (sud)	48	San Vitale	280208	4928272
			Cerba	280162	4928288
			Pirottolo	280181	4928274



*Fig. 3.10 Schema di un transetto di campionamento. A )transetto visto dall'alto e B) transetto visto di profilo. (da Buscaroli A.)*

Sono stati effettuati due campionamenti: uno in primavera ed uno in estate. La scelta di effettuare un duplice campionamento è stata basata su conoscenze specifiche sulla pineta apprese da Bucaroli e Zannoni (2010), in relazione alla supposta variazione della salinità dei suoli in tali periodi. Ci si aspettava infatti che il periodo primaverile fosse caratterizzato da un popolamento ben sviluppato in tutte le stazioni campionate, a causa della salinità più bassa per le temperature miti ed elevata piovosità mentre nel periodo estivo ci si aspettava un maggiore stress dovuto alla salinizzazione sul popolamento edafico per elevate temperature e piovosità molto scarse. Inoltre, un aspetto chiave per capire la struttura della comunità e la sua dinamica ecologica è la variabilità temporale, che potrebbe influenzare le relazioni

trofiche delle comunità del suolo (McCann et al., 2005). Le comunità del suolo mostrano infatti variabilità stagionali e annuali nella composizione, pertanto è rilevante capire la struttura del suolo e della dinamica di comunità, specialmente in sistemi altamente variabili (Bengtsson e Berg, 2005).

Il campionamento primaverile è stato compiuto nei giorni 6-7-10 maggio 2010, mentre quello estivo nei giorni 21-22-23 luglio 2010, avendo cura di effettuarli nel più breve tempo possibile per garantire omogeneità riguardo le condizioni di raccolta dei campioni.

- In totale sono stati raccolti 108 campioni: uno primaverile ed uno estivo per ogni punto di prelievo, tre punti di prelievo per stazione, tre stazioni per transetto, tre transetti per ciascuna delle due zone (est e ovest).
- Ogni campione è stato identificato da un codice costituito da :
  - un numero da 1 a 6 che identifica il transetto di appartenenza (e di conseguenza la zona);
  - una stringa di 2 o 3 lettere maiuscole che indica la stazione all'interno del transetto (SV: stazione su suolo San Vitale, CER: stazione su suolo Cerba, PIR: stazione su suolo Pirottolo);
  - un'ulteriore lettera maiuscola (A, B oppure C) che identifica il punto di prelievo;
  - una lettera minuscola (p oppure e), che identifica la stagione di raccolta.
- A titolo di esempio: 2PIRAp, identifica il campione primaverile raccolto nel punto A nella stazione Pirottolo del transetto 2.

### **3.2.2 Campionamento ed estrazione degli invertebrati del suolo**

In ogni punto di campionamento è stato prelevato un campione integrato costituito dall'unione di tre carote di suolo. Per la raccolta delle carote è stato utilizzato un piantabulbi del diametro di 6 cm, inserito nel terreno per tutta la sua lunghezza, sino alla posizione dell'impugnatura (Fig. 3.11, B-C), arrivando così ad una profondità di 15 cm ottenendo una carota di suolo del volume pari a circa 424 cm<sup>3</sup>.



Al fine di evitare contaminazioni tra campioni si è provveduto alla pulizia del piantabulbi e al cambio dei guanti dopo ogni singola raccolta.

Le tre carote di suolo sono state raccolte in modo da costituire i vertici di un ipotetico triangolo equilatero i cui lati siano lunghi circa 15 cm (Fig. 3.11, D).

In presenza di lettiera, si è provveduto alla sua raccolta assieme al campione ed in presenza di copertura erbacea, questa è stata asportata con l'uso di forbici avendo cura di non alterare la lettiera ed il suolo sottostante.

I tre sottocampioni così raccolti sono stati riposti delicatamente in un unico sacchetto di plastica, delle dimensioni di 35 cm in larghezza e 50 cm in altezza, avendo cura di mantenere una riserva d'aria e di conservarli in un luogo ombroso, al fine di mantenere l'integrità degli organismi animali sino al momento del trattamento dei campioni (Fig. 3.11, E).

Al fine del riconoscimento dei campioni, su ogni sacchetto è stato indicato: il luogo d'interesse, il codice identificativo del singolo campione, la stazione di raccolta e la data di campionamento. Tali annotazioni sono state riportate anche su un'etichetta inserita all'interno del sacchetto.



A



B



C



D



E

*Fig. 3.11 Il campionamento dei microartropodi; il punto di prelievo prima del campionamento (A); la preparazione del punto di prelievo (eliminazione della copertura erbacea e lo strumento utilizzato per la raccolta (B); il prelievo della carota di suolo (C); la posizione delle tre carote di suolo preleviate (D); il campione finale (E).*

I campioni raccolti sono stati trasportati in laboratorio, dove si è proceduto alla misura del loro peso (peso fresco). Per l'estrazione degli invertebrati si è fatto riferimento al manuale da campo per l'applicazione del metodo QBS-ar (Codurri *et al.*, 2005).

In base al metodo del selettore di Berlese-Tullgren, ogni campione è stato collocato all'interno di un imbuto avente il diametro di 26,5 cm, sopra una reticella a maglie di 2 mm circa, in modo omogeneo, avendo cura di frantumare eventuali aggregati di terreno che avrebbero potuto costituire dei microambienti di rifugio per la pedofauna (Fig. 3.12 A-B).

Inoltre, per evitare possibili fughe degli invertebrati, è stata posizionata, sopra l'imbuto, una barriera cilindrica in plexiglass.

Al di sotto dell'imbuto è stato collocato un recipiente di raccolta riempito per la metà del suo volume con alcool all'80%.

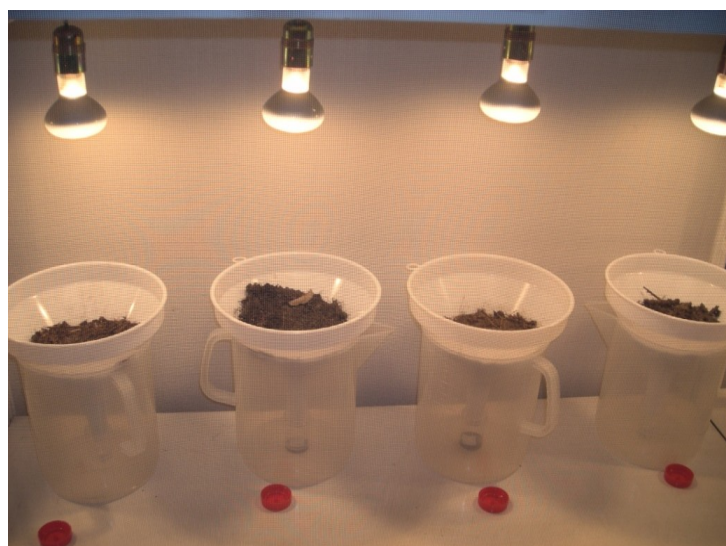
Il tutto è stato posto sotto una lampada da 40 W, posta a circa 20 cm di distanza, con lo scopo di provocare l'allontanamento degli organismi animali dalla superficie, in relazione al fatto che questi tendono a fuggire dalla luce, dal calore e dall'essiccazione prodotti dalla lampada e a rifugiarsi nell'ambiente buio, umido e fresco della parte più bassa del campione. In tal modo si spostano verso il basso, in direzione del collo dell'imbuto, fino a cadere nel recipiente sottostante, venendo così fissati (Fig. 3.12 C). Il campione ottenuto è chiamato selettura.

L'estrazione ha avuto una durata totale di quattordici giorni, tuttavia, dopo i primi sette giorni si è provveduto alla sostituzione del contenitore di raccolta con uno nuovo per valutare lo stato del processo di estrazione. Inoltre, tramite un controllo giornaliero, si è provveduto all'aggiunta di alcool all'80% quando necessario.

Infine, sono state effettuate delle ulteriori sostituzioni dei contenitori che presentavano significative quantità di suolo o lettiera caduti accidentalmente attraverso l'imbuto, per evitare la perdita, il danneggiamento o l'essiccazione della selettura.



A



B



C

*Fig. 3.12 Estrazione dei micrartropodi dai campioni di suolo con il metodo di Berlese-Tullgren. Preparazione (A), estrazione (B) e selezione ottenuta (C).*



### 3.2.3 Riconoscimento e tassonomia degli invertebrati

Tutte le selezioni sono state osservate al microscopio stereoscopico, separando a vista gli invertebrati dai residui di sabbia, suolo e detrito organico eventualmente caduti dagli imbuto durante la fase di estrazione. Si è passati quindi al riconoscimento dei microartropodi in conformità alle indicazioni del metodo QBS-ar, secondo il quale gli organismi vengono identificati per grandi gruppi, a livello di phylum, classe o, al massimo, ordine. Sono stati inoltre identificati, sempre a livello di taxa elevati, anche gli invertebrati non appartenenti al phylum Arthropoda e quindi non utilizzati per l'applicazione del QBS-ar.



*Fig 3.13 Fase di riconoscimento degli invertebrati*

Per tale scopo, è stato utilizzato uno stereoscopio a 40 ingrandimenti con illuminazione radente a lampada. La misurazione della grandezza degli organismi, nei casi in cui è risultata necessaria, è stata effettuata tramite un foglietto di carta millimetrata posto sotto la capsula di Petri.

Gli individui raggruppati per taxa sono stati conservati in *ependorf* da 2 ml contenenti alcool all'80%.

Il riconoscimento è stato reso possibile grazie all'utilizzo delle due chiavi identificative presenti all'interno del manuale da campo per l'applicazione del metodo QBS-ar (Codurri *et al.*, 2005), ovvero la “Chiave fenetica per il riconoscimento dei principali gruppi di microartropodi del suolo per il calcolo del QBS” ed il Libro Chiave.

Inoltre, sono stati utilizzati anche i testi di Coineau *et al.* (1997), Menta (2008) e di Latella & Gobbi (2008).

Ai fini dell'analisi statistica, oltre al riconoscimento dei microartropodi e degli altri invertebrati, si è proceduto anche al loro conteggio. In totale sono stati individuati, identificati e conteggiati circa 29 mila individui.

### **3.2.4 Calcolo del QBS-ar e del QBS-ar max**

Terminato l'esame della selettura al microscopio, si sono rilevate le diverse forme biologiche (FB) di microartropodi presenti in ogni campione, assegnando ad ognuna il relativo punteggio (EMI, Indice Ecomorfologico).

In base a quanto definito da Parisi (2001) e riportato nel manuale da campo per l'applicazione del metodo QBS-ar (Codurri *et al.*, 2005), le forme biologiche sono gruppi di organismi caratterizzati dall'avere gli stessi caratteri morfologici convergenti, in conseguenza del processo di adattamento al suolo. Proprio in base al grado di adattamento della forma biologica alla vita nel suolo è definita la scala di riferimento degli EMI, che variano da un minimo di 1 ad un massimo di 20 (Tab.3.2).

Tab.3.2 Indici Ecomorfologici (EMI) per il calcolo del QBS-ar (Parisi, 2001).

Gruppo	Punteggio	Note esplicative della tabella 1	
Proturi	20	<p>Per alcuni gruppi sistematici è indicato un solo valore di EMI, in altri casi un intervallo. Nel primo caso si tratta di un valore massimale ritenuto rappresentativo del livello di adattamento al suolo del gruppo stesso, nel secondo caso non si è ritenuto corretto attribuire un unico valore di EMI, data la variabilità di caratteri presenti all'interno del gruppo. Fatta eccezione per i Collemboli, per i quali è stato elaborato un apposito sistema di determinazione del valore di EMI (che andrà diviso per due, in quanto il valore massimo possibile è 40 e non 20 come nel sistema generale), per gli altri gruppi si applica il seguente sistema.</p> <p><b>Onotteri</b> In generale il valore EMI è pari a 1, salvo il genere <i>Grillotalpa</i> (di agevole riconoscimento). Si osservi tuttavia che si tratta più propriamente di megafauna e pertanto non andrebbero conteggiati, come del resto i membri della famiglia <i>Grillidae</i>. Per essi l'EMI è uguale a 20.</p> <p><b>Emitteri</b> Si tratta di forme per la maggior parte epigee o radicolate punti 1 Larve delle cicale, per le quali vale l'osservazione fatta per gli Onotteri punti 10</p> <p><b>Coleotteri</b> Per le forme chiaramente epigee i principali adattamenti alla vita endogena rilevabili nell'ispezione diretta degli esemplari sono: a) dimensioni inferiori a 2 mm punti 4 b) tegumenti sottili, con colori spesso testacei punti 5 c) microattinismo o attinismo (relativamente alle ali metatoraciche, carattere rilevabile per trasparenza) punti 5 d) microftalmia o anoftalmia punti 5 Nel caso di forme edalobie (che presentano tutti i caratteri sopra esposti) il valore di EMI è 20. Per queste forme è utile la consultazione del lavoro di Coiffait, 1958.</p> <p><b>Imenotteri</b> In generale punti 1 Formicidi punti 5</p> <p><b>Araneidi</b> Forme superiori ai 5 mm punti 1 Forme piccole e scarsamente pigmentate punti 5</p> <p><b>Diplopodi</b> Forme superiori ai 5 mm punti 10 Forme inferiori ai 5 mm punti 20</p> <p><b>Chilopodi</b> Forme superiori ai 5 mm, ma con zampe ben sviluppate punti 10 Altre forme, in particolare i Geofilomorfi punti 20</p>	
Dipluri	20		
Collemboli	1-20		
Microcoryphia	10		
Zygentomata	10		
Dermatteri	1		
Ortotteri	1-20		
Embiotteri	10		
Blattari	5		
Psocotteri	1		
Emitteri	1-10		
Tisanotteri	1		
Coleotteri	1-20		
Imenotteri	1-5		
Ditteri (larve)	10		
Altri olometaboli (larve)	10		
(adulti)	1		
<b>Per gli altri microartropodi viene proposto il seguente punteggio:</b>			
Pseudoscorpioni	20		
Palpigradi	20		
Opilioni	10		
Araneidi	1-5		
Acari	20		
Isopodi	10		
Diplopodi	10-20		
Pauropodi	20		
Sinfili	20		
Chilopodi	10-20		

Quei gruppi tassonomici di microartropodi che comprendono specie tutte con lo stesso grado di adattamento alla vita edifica, corrispondono ad un'unica forma biologica, e perciò hanno un solo valore di EMI. Gli altri gruppi, come ad esempio collemboli e coleotteri, che comprendono specie a diverso grado di adattamento e dunque varie forme biologiche, hanno differenti valori di EMI.

Dopo aver definito gli EMI per i diversi gruppi individuati, si è proceduto con il calcolo dell'indice QBS-ar per ogni singolo campione, utilizzando la scheda apposita, fornita dal manuale (Tab. 3.3). L'indice QBS-ar è la sommatoria di tutti gli EMI identificati. In particolare, per i gruppi che presentano diverse forme biologiche, e dunque differenti EMI, si considera solo il valore di EMI maggiore mostrato dal gruppo in un certo campione (Parisi, 2001). In base a quanto stabilito dal metodo, più è grande il valore di questo indice, maggiore è la qualità ecologica del suolo



Tab.3.3 Scheda per il calcolo dell'indice QBS-ar (EMI totale), relativa ad un singolo campione (da Codurri et al.,2005 modificata).

Sigla	Località	Prelievo	Fine Estr.	Smistamento
	GRUPPI	EMI	Presenza/ Assenza	N° individui
Pseudoscorpioni		20		
Scorpioni	Forme giovanili	10		
Palpigradi		20		
Opilioni		10		
Aranei	Forme superiori a 5mm	1		
	Forme piccole e poco pigmentate	5		
Acari		20		
Isopodi		10		
Diplopodi	Forme superiori a 5mm	10		
	Forme inferiori a 5mm	20		
Paupodi		20		
Sinfili		20		
Chilopodi	superiori ai 5 mm, ma con zampe ben sviluppate	10		
	Altre forme (Geofilomorfi)	20		
Proturi		20		
Dipluri		20		
Collemboli	Forme epigee: appendici allungate, ben	1		
	Forme epigee non legate alla vegetazione	2		
	Forme di piccola dimensione con medio	4		
	Forme emiedafiche con apparato visivo ben	6		
	Forme emiedafiche con riduzione del numero	8		
	Forme euedafiche con pigmentazione assente	10		
	Forme euedafiche depigmentate, prive di furca, appendici tozze, presenza di pseudoculi, organo postantennale sviluppato (ma non necessariamente presente), strutture sensoriali apomorfiche	20		
Microcorifi		10		
Zigotomi		10		
Dermatari		1		
Ortotteri	In generale	1		
	Famiglia Grillidae	20		
Embiotteri		10		
Fasmodei		1		
Mantodei		1		
Mecotteri		1		
Isotteri		10		
Blattari		5		
Psocotteri		1		
Emitteri	Forme epigee	1		
	Larve cicale	10		
Rafidiotteri		1		
Tisanotteri		1		
Coleotteri (*)	Forme epigee	1		
	Dimensioni < 2mm	+ 4		
	Tegumenti sottili, con colori testacei	+ 5		
	Microatterismo o atterismo	+ 5		
	Microftalmia o anoftalmia	+ 5		
	Nel caso di forme edafobie	20		
Imenotteri	In generale	1		
	Formicidi	5		
Ditteri	adulti	1		
Rafidiotteri (larve)		10		
Planipenni (larve)		1		
Mecotteri (larve)		10		
Coleotteri (larve)		10		
Ditteri (larve)		10		
Imenotteri (larve)		10		
Lepidotteri (larve)		10		
Altri olometaboli	adulti	1		

Dopo aver determinato l'indice QBS-ar per tutti i campioni, si è provveduto a calcolare il valore dell'indice QBS-ar max (QBS massimale), corrispondente alla sommatoria degli EMI associati a tutte le forme biologiche trovate complessivamente nei tre campioni (A, B, C) di ogni stazione.

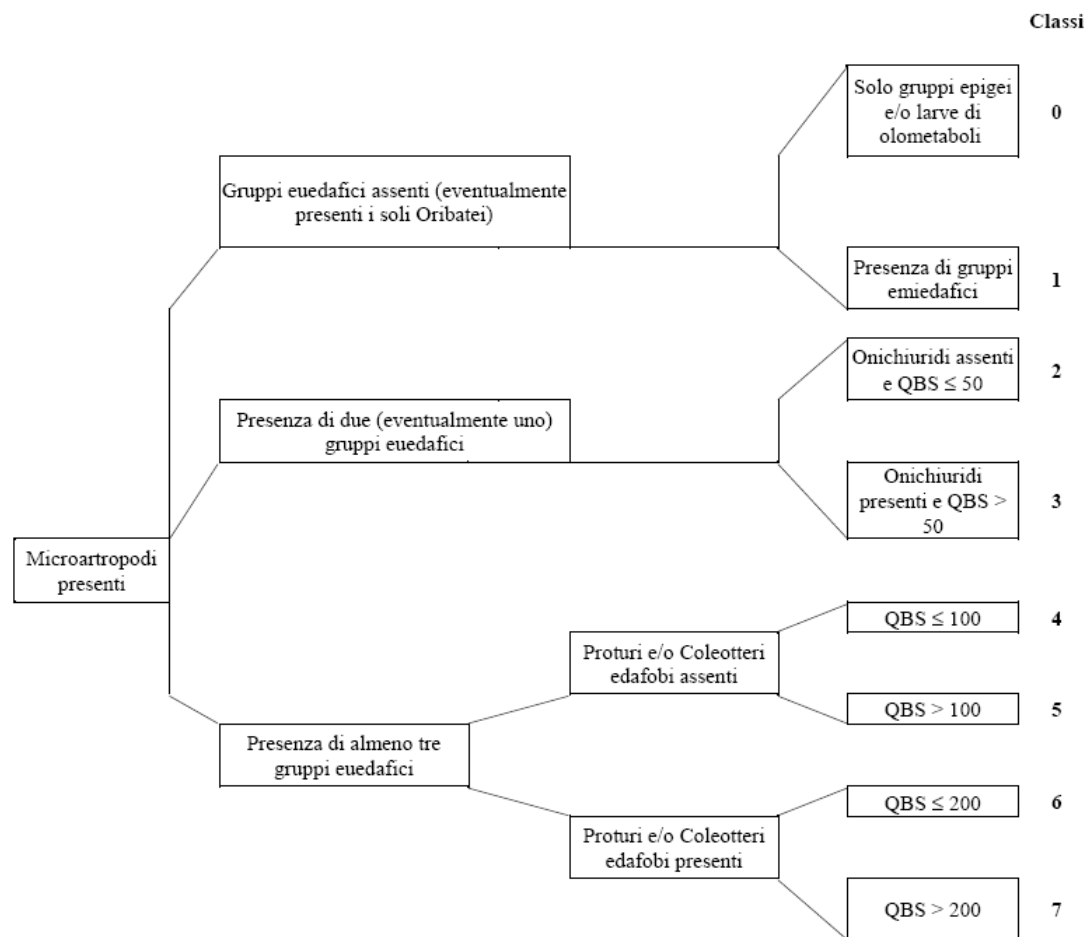
In particolare, in presenza di taxa contenenti più forme biologiche, è stato considerato solo il valore di EMI maggiore tra quelli trovati nei tre campioni, come indicato dal manuale (Codurri *et al.*, 2005). Ad esempio, se nei tre campioni sono stati trovati individui del gruppo Araneidi corrispondenti sia al valore di EMI 1, sia al valore di EMI 5, nel calcolo dell'indice QBS-ar max è stato considerato solo il valore 5. Per la determinazione dell'indice QBS-ar max è stata utilizzata un'altra scheda (Tab. 3.4), fornita sempre dal manuale, nella quale sono stati riportati i valori di EMI definiti per le forme biologiche individuate nei tre campioni (indicati come repliche nella scheda) e i valori dell'indice QBS-ar calcolati per ciascun campione.

Tab.3.4 Scheda per il calcolo dell'indice massimale QBS-ar max relativa ad una stazione, (da Codurri et al., 2005 modificata).

Località		Date			
		Prelievo	Fine Estr.	Smistamento	
		1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1				
	5				
Acari	20				
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20				
Paupodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20				
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20				
Microcorifi	10				
Zigotomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1				
Coleotteri (*)	1				
	+ 4				
	+ 5				
	+ 5				
	+ 5				
	20				
Imenotteri	1				
	5				
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10				
Ditteri (larve)	10				
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS					

### 3.2.5 Le classi di qualità del suolo

Dopo aver determinato i valori di QBS-ar max per le stazioni di tutti i transetti, si è proseguito con l'identificazione delle classi di qualità del suolo. La classificazione è avvenuta sulla base dello schema riportato in Fig. 3.14, nel quale sono definite otto classi di qualità (dalla classe 0 alla classe 7), in ordine crescente di complessità del popolamento in relazione all'adattamento alla vita edafica.



note:

- 1- per gruppi euedafici si intendono le forme biologiche con EMI = 20
- 2- per Onichiuridi si intendono Collemboli con EMI = 20
- 3- nel caso di Onichiuridi assenti e  $QBS > 50$  o di Onichiuridi Presenti e  $QBS \leq 50$ , si propongono rispettivamente le classi 2/3 e 3/2

Fig. 3.14. Suddivisione in classi dei valori di QBS-ar (classificazione definita da Parisi, 2001 e modificata in seguito da D'Avino, 2002).

### **3.2.6 Campionamento per le analisi chimiche**

Immediatamente dopo la raccolta dei campioni per l'esame dei microartropodi, negli stessi punti di prelievo sono stati raccolti i campioni dell'orizzonte superficiale del suolo (orizzonte A) sui quali sono state effettuate in seguito le analisi di: conduttività elettrica (CE, dS/m), pH, contenuto d'acqua (%). Le determinazioni del contenuto di sabbia (g/kg), limo (g/kg), argilla (g/kg), carbonio organico totale (TOC, g/kg), azoto totale Kjeldahl (NTK, g/kg) e il rapporto C/N sono state condotte solo sui campioni B e solo nel periodo primaverile poiché tali caratteristiche rimangono invariate se si considerano brevi intervalli di tempo, come in questo caso. I campioni, del peso di circa 500 g ciascuno, sono stati prelevati con l'ausilio di una sessola e riposti in sacchetti di plastica opportunamente contraddistinti dalle indicazioni riguardanti la stazione, la data di raccolta e la sigla dello specifico campione.

Il prelievo ha riguardato i primi 10-15 cm di suolo, avendo cura di rimuovere lo strato di lettiera sovrastante eventualmente presente. Al fine di evitare contaminazioni tra campioni si è provveduto alla pulizia della sessola dopo ogni singola raccolta.

Le analisi chimiche del suolo e dell'acqua di falda, sono state eseguite secondo i metodi riportati in MiPAF (2000).

Tabella 3.1. Analisi chimico fisiche svolte su suoli ed acque per la caratterizzazione pedologica (da MiPAF 2000, modificato).

<b>Analisi suoli e parametri derivati</b>	<b>Metodica: Suppl. Ord. G.U. n. 248/1999 - Standard internazionale</b>	<b>Strumentazione principale</b>
Tessitura	Metodo n. II.6	Setacci ASTM, cilindri ASTM C1 271, idrometro ASTM 152 H
Grado di reazione (pH)	Metodo n. III.1 - ISO 10390	pH-metro
Conduttività elettrica (CE)	Metodo n. IV.1 - ISO 11265 (1)	Conduttimetro
Carbonio organico (C org.)	Metodo n. VII.3	Reagenti e vetreria da laboratorio
Azoto totale (N tot.)	Metodi n. XIV.2 e n. XIV.3 - ISO 11261	Digestore e distillatore Kjeldahl in corrente di vapore VELP® UDK 126 A
Rapporto C/N		
<b>Analisi acque di falda e di superficie</b>	<b>Metodica: Manuali e linee guida 29/2003</b>	<b>Strumentazione principale</b>
Grado di reazione (pH)	Metodo 2060	pH-metro
Conduttività elettrica (CE)	Metodo 2030	Conduttimetro

1 : con rapporto suolo: acqua 1:2.5 (CE 1:2.5).

### 3.2.7 Analisi statistiche dei dati

Dal momento che sia le caratteristiche chimiche e fisiche del suolo, sia le caratteristiche del suo popolamento biologico sono descritte da un elevato numero di variabili, per l'analisi dei dati si è ritenuto opportuno utilizzare in prevalenza metodi statistici multivariati, cioè metodi in grado di descrivere i pattern di variazione e di valutare le differenze tra diversi campioni sulla base di più variabili simultaneamente.

Per la valutazione sui tipi di analisi da compiere e su come applicarle soprattutto in relazione agli obiettivi del presente studio, come supporto teorico si è fatto riferimento a Clarke & Warwick (2001), Anderson *et al.* (2008) e Legendre & Legendre (1998).

Per l'applicazione dei metodi sono stati utilizzati i software STATISTICA e PRIMER 6 (Clarke & Gorley, 2006).

### **3.2.7.1 dati utilizzati**

Il punto di partenza per tutti i metodi di analisi multivariata è costituito dalle matrici dati, cioè tabelle in cui ogni colonna rappresenta una variabile e ogni riga rappresenta un campione; in tal modo ogni cella corrisponde al valore associato ad una specifica variabile per un certo campione. Va notato che questa convenzione di uso generale, adottata nel presente lavoro, è diversa da quella spesso usata nelle applicazioni dell'analisi multivariata in ecologia di comunità, secondo cui le variabili (in questo caso le specie o altri taxa) sono lungo le righe e i campioni lungo le colonne (Clarke & Warwick, 2001).

Nel presente studio sono state utilizzate quattro diverse matrici dati. La prima contiene i dati relativi alle caratteristiche chimiche e fisiche del suolo che sono state misurate in tutti i punti di prelievo, cioè nelle repliche A, B e C di tutte le stazioni: CE, pH, contenuto in acqua in % (tre variabili per 108 campioni).

La seconda matrice contiene i dati relativi alle caratteristiche chimiche e fisiche del suolo misurate solo sul punto di prelievo in posizione centrale di ciascuna stazione (campioni B), corrispondenti, oltre a CE, pH e contenuto d'acqua, al contenuto di sabbia, limo, argilla, TOC, TKN e il rapporto C/N (nove variabili per 36 campioni).

La terza matrice contiene i dati biologici di tutti i campioni: sono state considerate le densità numeriche relative a tutti i taxa individuati, in termini di numero di individui per campione (17 variabili per 108 campioni).

La quarta matrice contiene i dati biologici solo dei campioni B, le variabili sono le stesse della terza matrice appena descritta, ma in questo caso si considera un suo sottoinsieme per valutare la correlazione con i dati abiotici raccolti solo sui campioni B (17 variabili per 36 campioni). I dati abiotici relativi alle prime due matrici sono stati normalizzati, secondo l'accezione data a questo termine da Clarke & Warwick (2001), intendendo in tal modo che i dati hanno subito una elaborazione volta ad eliminare l'effetto delle unità di misura e degli intervalli di variazione propri di ogni variabile.

Per quanto riguarda le matrici contenenti dati biologici, per pesare in modo equilibrato il contributo dei differenti taxa, alcuni rari, altri molto abbondanti, è stata applicata come trasformazione la radice quarta. Tale trasformazione è comunemente ritenuta tra le più consone per questo tipo di dati perché, come sostenuto anche da Clarke & Warwick (2001), permette anche ai taxa rari di influire sul risultato delle analisi, senza però che il loro contributo diventi eccessivamente importante rispetto a quello dei taxa abbondanti.

### **3.2.7.2 Misure di distanza**

Nella maggior parte dei metodi di analisi multivariata il primo passo consiste nella creazione, a partire dalla matrice dati, di una matrice di associazione, mediante il calcolo di un coefficiente di associazione (Legendre & Legendre, 1998).

Per coefficiente di associazione s'intende una misura che quantifichi il grado di somiglianza o differenza tra due campioni (modalità Q) o tra due variabili (modalità R).

Rientrano in questa categoria i coefficienti di similarità, di dissimilarità, di dipendenza. La matrice di associazione è una matrice quadrata in cui, se si effettua un'analisi in modalità Q, sia le righe che le colonne rappresentano i campioni. Se si effettua un'analisi in modalità R invece sia le righe che le colonne rappresentano variabili. Ogni elemento della matrice è costituito dal valore ottenuto calcolando il coefficiente di associazione prescelto tra il campione (o la variabile) corrispondente alla riga e il campione (o la variabile) corrispondente alla colonna.

Per i dati biologici, come coefficiente di associazione, è stata considerata la distanza definita dall'indice di dissimilarità di Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957), applicata sui dati di abbondanza trasformati con la radice quarta, ottenendo la matrice delle distanze tra coppie di campioni.

### **3.2.7.3 Analisi delle componenti principali (PCA)**

Per la rappresentazione delle relazioni tra campioni, definite dalle matrici di distanze euclidee ottenute a partire dalle variabili abiotiche, è stata applicata la PCA,



una tecnica di ordinamento ben affermata e largamente utilizzata in molti settori scientifici.

In statistica multivariata sono indicati come tecniche di ordinamento tutti i metodi che hanno l'obiettivo di rappresentare un sistema di per sé caratterizzato da un elevato numero di dimensioni, utilizzando un numero di dimensioni ridotto, usualmente due o al massimo tre. Questi metodi descrivono il sistema di interesse utilizzando, al posto delle  $n$  variabili effettivamente misurate, due o tre variabili, definite dal metodo stesso, che hanno la proprietà di conservare nella maggior misura possibile l'informazione originale. Uno dei vantaggi di tale approccio è la possibilità di rappresentare graficamente i campioni come punti in un piano, utilizzando come assi cartesiani le nuove variabili, permettendo di valutarne visivamente le relazioni. In altri termini, le tecniche di ordinamento possono essere intese come metodi grafici per visualizzare l'informazione contenuta nella matrice di associazione.

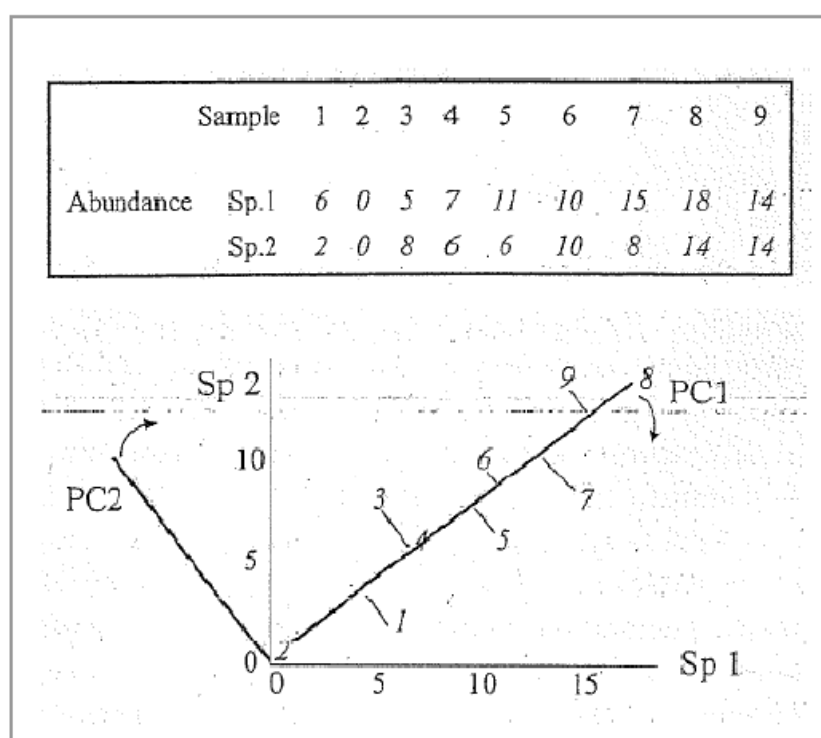
I diversi metodi di ordinamento hanno in comune il principio generale appena descritto, ma differiscono tra loro per quanto riguarda il modo di definire le variabili utilizzate per la rappresentazione. L'idea che sta alla base della PCA è individuare nuove variabili, dette componenti principali (PC) che siano combinazioni lineari di quelle originali. Queste nuove variabili sono individuate in ordine in modo che la prima (prima componente principale, PC1) sia quella con la varianza più elevata; la seconda componente principale (PC2) è la variabile con la varianza più elevata tra tutte quelle ortogonali alla prima, e così via. La riduzione della complessità avviene proprio limitandosi ad analizzare e a utilizzare come assi per la rappresentazione grafica solo le prime due o tre PC, quelle che rappresentano la maggior parte della variazione totale presente nei dati.

L'aspetto che distingue la PCA da altri metodi di ordinamento è che esiste una relazione diretta tra i nuovi assi e le variabili originali. I coefficienti applicati alle variabili originali, nella combinazione lineare che definisce ciascuna PC, esprimono il peso di ciascuna delle variabili originali nella definizione della nuova variabile.

Il principio della PCA può essere compreso a partire da casi semplificati ipotetici, in cui i campioni sono descritti da solo due o tre variabili. Considerando l'esempio riportato in Fig. 3.17, avendo due variabili, misurate per un certo numero di campioni, rappresentabili dagli assi cartesiani di uno spazio a due dimensioni, si può attuare una

trasformazione proiettando i punti (i valori delle due variabili calcolati per ciascun campione) su un nuovo asse che approssima al meglio lo spazio a due dimensioni, riproducendo al meglio le distanze tra campioni, riducendolo ad uno spazio a una dimensione.

*Fig. 3.17 Esempio dell'applicazione della PCA nel caso di due variabili (Sp1 e Sp2) (Clarke & Warwick, 2001).*



Aumentando il numero di variabili da due a tre, passando quindi ad uno spazio a tre dimensioni, si può applicare la trasformazione ottenendo tre nuove variabili rappresentate da tre nuovi assi, rotazioni degli assi originali. Sebbene il primo asse sia quello associato alla nuova variabile con la maggiore varianza, in questo caso il secondo asse assume maggiore importanza in termini di rappresentazione della varianza tra campioni, rispetto alla situazione con sole due variabili. Pertanto si considera uno spazio a due dimensioni definito da due nuovi assi, che meglio approssima le distanze tra i campioni. Il terzo asse, perpendicolare agli altri due, corrisponde ad una nuova variabile trascurabile riguardo alla varianza rappresentata.

Considerando infine la situazione con un certo numero di variabili corrispondenti ad uno spazio a più dimensioni dove collocare i campioni, ci sono due approssimazioni più comunemente utilizzate: la prima corrisponde ad uno spazio a due dimensioni, la seconda prevede un ordinamento in uno spazio tridimensionale,. La scelta tra queste due approssimazioni ma anche quella di considerare eventualmente anche altre PC, avviene in base alla variazione spiegata, espressa in percentuale di quella totale. Secondo quanto riportato da Clarke & Warwick (2001) la nuova rappresentazione è ritenuta comunemente valida se rappresenta circa il 70-75 % della variazione originaria.

#### **3.2.7.4 Analisi delle coordinate principali (PCO)**

Per l'ordinamento dei dati biologici, sulla base della matrice di distanze di Bray-Curtis, è stata applicata la PCO.

Come espresso da Gower (1966), la PCO rappresenta un'estensione della PCA che permette l'ordinamento dei campioni, secondo un'ampia tipologia di distanze e non solamente quella euclidea. La PCO produce una rappresentazione dei campioni nello spazio euclideo rispettando le relazioni di distanza calcolate attraverso qualsiasi misura di distanza, nel nostro caso quella di Bray-Curtis. Nella PCO la rappresentazione dei campioni nello spazio ridotto delle prime coordinate principali, corrisponde alla migliore approssimazione euclidea possibile delle distanze originali. Rispetto alla PCA, per la quale esiste una diretta relazione tra le coordinate principali e le variabili originarie, nella PCO le variabili originarie non hanno alcun ruolo diretto nel calcolo delle nuove coordinate, ma servono solo a determinare la matrice delle distanze tra i campioni (Legendre & Legendre, 1998).

Quando la PCO è applicata ad una matrice di distanze euclidee, si ottiene un ordinamento dei punti assolutamente equivalente a quello prodotto dalla PCA.

#### **3.2.7.5 Analisi multivariata della varianza per permutazioni (PERMANOVA)**

Il piano di campionamento adottato in questo studio corrisponde ad un disegno sperimentale a quattro fattori: zona, transetto, pedotipo e stagione. Il primo fattore,

considerato fisso, ha assunto due livelli, est e ovest; il secondo, considerato *random* (si potrebbero identificare molti altri transetti), ne ha assunti sei (tre per ogni livello del fattore zona), in base al numero di transetti identificati; il terzo, anch'esso fisso, ha assunto tre livelli, San Vitale, Cerba e Pirottolo. Il quarto, ha due livelli, primavera ed estate. Inoltre, sia i fattori zona e pedotipo, che i fattori transetto e tipo di suolo, avendo un rapporto reciproco simmetrico, sono stati considerati ortogonali tra loro (ogni pedotipo è presente in tutte e due le zone e in tutti i transetti). Il fattore transetto è stato considerato *nested* (gerarchizzato) nel fattore zona (ogni transetto ha una specifica collocazione in una sola delle due zone).

Per verificare se i fattori identificati avessero effetti statisticamente significativi è stata applicata l'analisi multivariata della varianza basata sulle permutazioni (PERMANOVA, Anderson, 2001). La PERMANOVA, come l'analisi della varianza classica (ANOVA) confronta tra loro gruppi di campioni definiti sulla base di uno o più fattori, detti anche criteri di classificazione. A differenza dell'ANOVA però, utilizza indici di similarità o dissimilarità multivariati, e fornisce test di ipotesi nulle sulla base di procedure di permutazione (Anderson *et al.*, 2008).

Sebbene possa essere applicata in diversi ambiti, dalla zoologia, alla genetica e perfino alla psicologia, la PERMANOVA viene utilizzata principalmente per l'analisi di dati ecologici, specialmente in termini di abbondanze di specie.

Come altre tecniche di permutazione, la PERMANOVA è adatta all'analisi di dati che non soddisfano le assunzioni tipiche della statistica tradizionale, sia per l'elevato numero di variabili considerate, sia perché una o più variabili non sono distribuite normalmente. L'unico vincolo è che sia i campioni che gli errori associati possano essere ricombinati, rispettando una specifica ipotesi nulla. In altre parole, queste tecniche non richiedono esplicite assunzioni sulle distribuzioni delle variabili originarie e utilizzano le permutazioni per ottenere la distribuzione di probabilità attesa nel caso in cui sia vera l'ipotesi nulla.

Anche nel caso della PERMANOVA, come per gli altri metodi di analisi multivariata, il punto di partenza è una matrice di associazione, nel caso presente la matrice di distanze euclidee per i dati abiotici, quella di dissimilarità di Bray-Curtis per i dati biologici.

Nell'ANOVA, vengono calcolate le differenze (scarti) tra le singole osservazioni appartenenti ad un gruppo e la media del gruppo stesso. I quadrati di queste distanze sono poi sommati tra loro per ottenere la somma dei quadrati residua ( $SS_{res}$ ), che è una misura cumulativa delle differenze presenti all'interno dei gruppi.

Nel caso multivariato la tendenza centrale di un campione è espressa dal centroide. Nella PERMANOVA, analogamente all'ANOVA, a partire dalla matrice di associazione tra campioni si calcolano le distanze tra i singoli campioni ed il centroide del gruppo a cui appartengono (Fig. 3.18 B). Anche in questo caso la somma dei quadrati delle distanze costituisce la  $SS_{res}$ .

Così come nell'ANOVA si calcolano poi le differenze tra medie dei singoli gruppi e la loro media, nella PERMANOVA si computano le distanze tra i centroidi dei gruppi e il centroide dei centroidi (Fig. 3.18 C). La somma dei loro quadrati costituisce la  $SS_A$  che rende conto delle differenze tra gruppi.

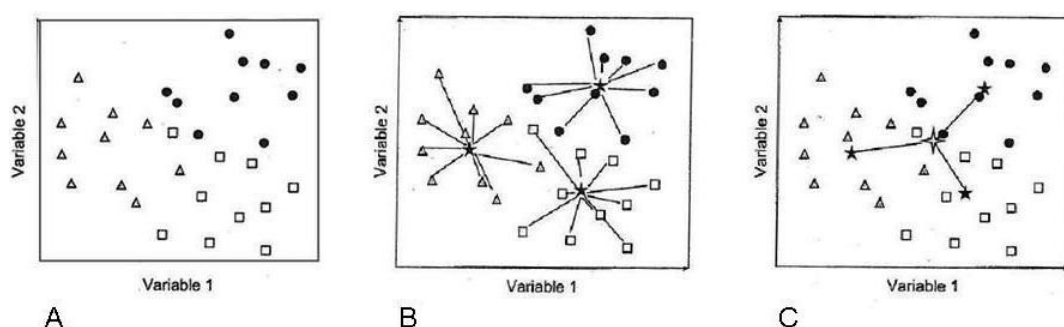


Fig. 3.18 PERMANOVA, calcolo delle distanze. Diagramma di un ipotetico dataset, formato da 2 variabili (due dimensioni) e 10 campioni per ciascun gruppo (A). Distanze dei campioni dai centroidi (B). Distanze dei centroidi dal centroide dei centroidi (C).

In base all'ipotesi nulla che sostiene l'assenza di differenze tra i campioni in ambito multivariato, è stato calcolato il rapporto pseudo  $F$ . Maggiore è il valore di pseudo  $F$  minore è la probabilità che l'ipotesi nulla sia vera.

Nell'ANOVA, sotto la condizione che siano rispettate le assunzioni del metodo (osservazioni indipendenti, distribuite normalmente e con varianze omogenee) e che sia rispettata l'ipotesi nulla, la distribuzione del rapporto  $F$  è conosciuta, cioè le probabilità associate ai suoi valori sono calcolabili usando un'equazione nota a priori.

Questo permette di calcolare quanto sarebbe probabile il valore di  $F$  se l'ipotesi nulla fosse vera.

Nella PERMANOVA invece la distribuzione dello pseudo  $F$  sotto l'ipotesi nulla deve essere calcolata in ogni analisi, volta per volta tramite le permutazioni. Secondo questo approccio, una volta calcolata la pseudo  $F$  con i gruppi così come sono stati effettivamente osservati, le singole osservazioni sono scambiate tra i gruppi secondo tutte le combinazioni possibili (o secondo un sottoinsieme casuale, se le combinazioni totali possibili sono in numero troppo elevato). Per ogni combinazione viene calcolato la pseudo  $F$ .

L'idea che sta alla base di tale procedura è che se è vera l'ipotesi nulla, per cui non si hanno differenze tra i campioni in relazione ad alcun fattore, allora è altrettanto vero che variando le relazioni tra i campioni sulla base dei vari fattori considerati non si avrà alcun cambiamento sulle loro differenze (Anderson *et al.*, 2008).

Nel nostro caso, in ogni analisi, ciascuna sorgente di variazione presente nel disegno sperimentale è stata testata tramite 9999 permutazioni *random* o comunque sino a realizzare tutte le ricombinazioni possibili, ottenendo in tal modo la distribuzione dello pseudo  $F$  se fosse rispettata l'ipotesi nulla.

Il livello di significatività del test è la probabilità di osservare un valore di pseudo  $F$  maggiore o uguale a quello effettivamente osservato, nel caso in cui l'ipotesi nulla sia vera. Lo pseudo  $F$  trovato inizialmente è considerato membro della distribuzione e pertanto viene inserito nel calcolo di  $P$  (probabilità di rigettare l'ipotesi nulla).

Nel caso delle caratteristiche chimiche del suolo si è utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) univariata. In questi casi l'omogeneità della varianza è stata valutata con il test di Cochran e, quando necessario, è stata ottenuta applicando ai dati un'opportuna trasformazione.

#### **3.2.7.6 Analisi SIMPER**

SIMPER (Similarity Percentage) è un semplice metodo per stimare quali taxa siano responsabili più di altri delle differenze fra due o più gruppi di osservazioni (Clarke, 1993). Per identificare le caratteristiche discriminanti, Simper calcola la media Bray-

Curtis di dissimilarità tra tutte le coppie inter-gruppo di campioni. Questa viene espressa in termini di contributo medio percentuale di ciascuna specie.

### **3.2.7.7 Procedura BIOENV**

La procedura BIOENV ha lo scopo di verificare la correlazione complessiva delle variabili che descrivono la struttura di un popolamento (abbondanze o biomasse dei taxa che compongono il popolamento) con le variabili abiotiche che descrivono l'ambiente chimico e fisico in cui il popolamento è insediato. In altri termini il metodo valuta se le caratteristiche abiotiche spiegano le differenze tra i popolamenti dei diversi campioni.

Deve essere sottolineato che, come tutti i metodi di correlazione BIOENV di per sé non può stabilire relazioni di causa-effetto ma solo misurare il grado di concordanza tra due insiemi di variabili. La procedura BIOENV si applica per analizzare il grado di corrispondenza tra una matrice di dati biologici (abbondanza, biomassa, ecc.) e una matrice di dati abiotici.

Più precisamente il metodo valuta il grado di concordanza tra la matrice di associazione costruita sulla base delle variabili biologiche e quella costruita sulla base delle variabili abiotiche, calcolando un coefficiente di correlazione tra i valori collocati nelle celle corrispondenti delle due matrici.

Il principio di BIOENV è che se le variabili abiotiche spiegano la struttura del popolamento, allora le relazioni tra campioni definite sulla base dei due insiemi di variabili sono equivalenti.

Nel presente studio la procedura è stata applicata a tutti i campioni per valutare la correlazione tra abbondanza dei taxa e CE, pH e contenuto d'acqua e ai soli campioni B per valutare la correlazione tra abbondanza dei taxa e le variabili abiotiche misurate solo su questo sottoinsieme. per tutti i campioni e la matrice con i dati biologici solo per i campioni B con quella contenente tutti i dati abiotici relativi solo ai campioni B.

È importante osservare che la spiegazione delle variabili biologiche può essere fornita anche solo da alcune variabili abiotiche e non necessariamente da tutte. Una

variabile che non contribuisce a spiegare i dati biologici tende ad abbassare il grado di correlazione tra le due matrici di associazione.

La procedura BIOENV, quindi non calcola solo la correlazione tra la matrice di associazione biologica e quella costruita a partire da tutte le variabili abiotiche, ma anche la correlazione con le matrici costruite a partire da tutti i possibili sottoinsiemi di variabili abiotiche. In questo modo individua quale combinazione massimizzi la correlazione tra le due categorie di dati. Una volta individuata la combinazione che fornisce la correlazione più elevata, viene utilizzato un test basato sulle permutazioni, per calcolare il corrispondente livello di significatività, analogamente a quanto viene fatto nella PERMANOVA. Nel presente studio sono state usate 999 permutazioni.

#### **3.2.7.8 *Bubble plots* (grafici a bolle)**

Secondo l'approccio multivariato, le relazioni tra campioni, espresse dalla matrice di associazione, sono determinate dalle variabili nel loro insieme. Può però essere importante valutare il ruolo svolto da una singola variabile nel determinare questi rapporti. In altri termini, anche se tutte le variabili concorrono al risultato, ci si può chiedere quale sia il peso di una singola variabile.

I *bubble plots* (grafici a bolle) sono un metodo per rappresentare graficamente il ruolo svolto da una singola variabile nel determinare le relazioni tra campioni; si ottengono sovrapponendo a un diagramma di ordinamento i valori della variabile di interesse. Per fare questo ogni campione è rappresentato sul piano di ordinamento utilizzando un cerchio (bolla) di diametro proporzionale al valore che la variabile selezionata assume per quel campione.



### **3.3 Risultati**

#### **3.3.1 Caratteristiche chimiche e fisiche della falda**

##### **Profondità della falda**

In Fig.3.28 è riportata la profondità della falda, cioè la distanza della falda dalla superficie del suolo, rilevata nelle tre stazioni di ciascuno dei sei transetti campionati. In tutti i casi, come atteso, la profondità aumenta lungo il transetto, in direzione Pirottolo-S.Vitale, in parallelo con l'aumento della quota assoluta del terreno. E' evidente l'abbassamento della falda in tutti i transetti nel periodo estivo rispetto alla primavera; la variazione è di 33.5 cm in media, con un massimo di 70 cm per la stazione 3 PIR. Fa eccezione il transetto 5, dove tale variazione è di soli 5 cm. Questo transetto è caratterizzato anche da una duna particolarmente elevata, tanto che non è stato possibile arrivare alla falda in corrispondenza della stazione 5SV e determinarne la profondità. Non tenendo conto di questa stazione, gli intervalli di variazione associati ai tre pedotipi sono i seguenti :

San Vitale: 115–194 cm in primavera, 152-216 cm in estate;

Cerba: 47-114 cm in primavera, 87-140 cm in estate;

Pirottolo: 10-43 cm in primavera, 40-95 cm in estate.

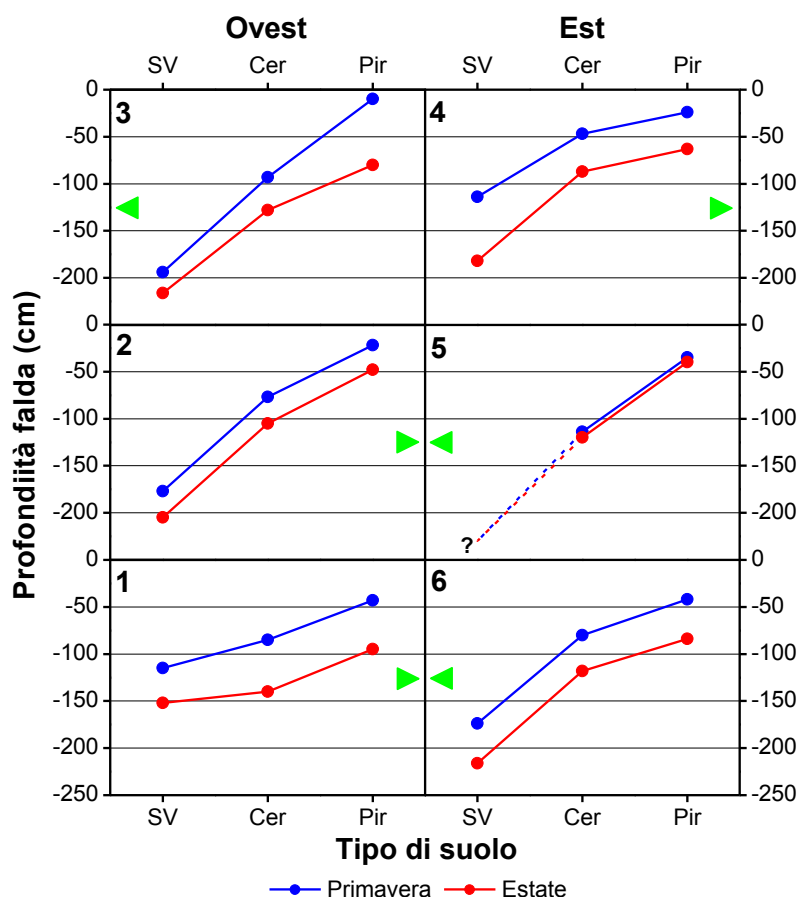


Fig. 3.28. Andamento della profondità di falda lungo i sei transetti campionati in primavera (blu) ed estate (rosso). Valori misurati in corrispondenza del punto di prelievo B di ogni stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Pila Baiona rispetto al transetto.

### Conduttività elettrica dell'acqua di falda

In molti casi la elevata profondità della falda in corrispondenza delle stazioni San Vitale, anche se ancora misurabile non ha permesso di raccogliere un campione d'acqua attendibile e quindi di misurarne le caratteristiche chimiche. Non si è quindi ritenuto opportuno applicare test statistici. Come è possibile vedere dal grafico in Fig. 3.29 la conduttività elettrica risulta aumentare dalla primavera all'estate in maniera significativa nei transetti 4 e 6. I valori più elevati registrati sono infatti per il 4PIRe pari a  $18.79 \text{ dS m}^{-1}$  mentre per il 6 CERe pari a  $18.72 \text{ dS/m}$ . Valori questi che corrispondono ad una salinità pari a 11.1 PSU (Practical Salinity Units) e che, se

paragonati alla conduttività elettrica dell'acqua di mare (51,3 dS/m) e cioè 35 PSU, risultano essere piuttosto elevati; valori simili difatti si riscontrano nelle acque salmastre. Una situazione anomala che non segue l'andamento crescente della conduttività elettrica dei transetti 4 e 6 la si trova nel transetto 5. Oltre al fatto che non è stato possibile prelevare il campione di acqua dalla falda nella stazione San Vitale, per cui il dato risulta mancante, il grafico mostra che vi è una situazione stabile a livello di falda sia nel Pirottolo che nel Cerba per via della presenza del canale Cerba che comporta un sistema complesso di apporto di acque dolci. Quindi, almeno per i transetti 4 e 6, si può affermare che nella zona est vi è una salinizzazione della falda durante il periodo estivo.

La situazione nella zona ovest rimane invece stabile durante tutto l'arco dell'anno, non mostrando aumento di conduttività elettrica nel periodo estivo. Pertanto la falda nella zona ovest non risulta soggetta a salinizzazione.

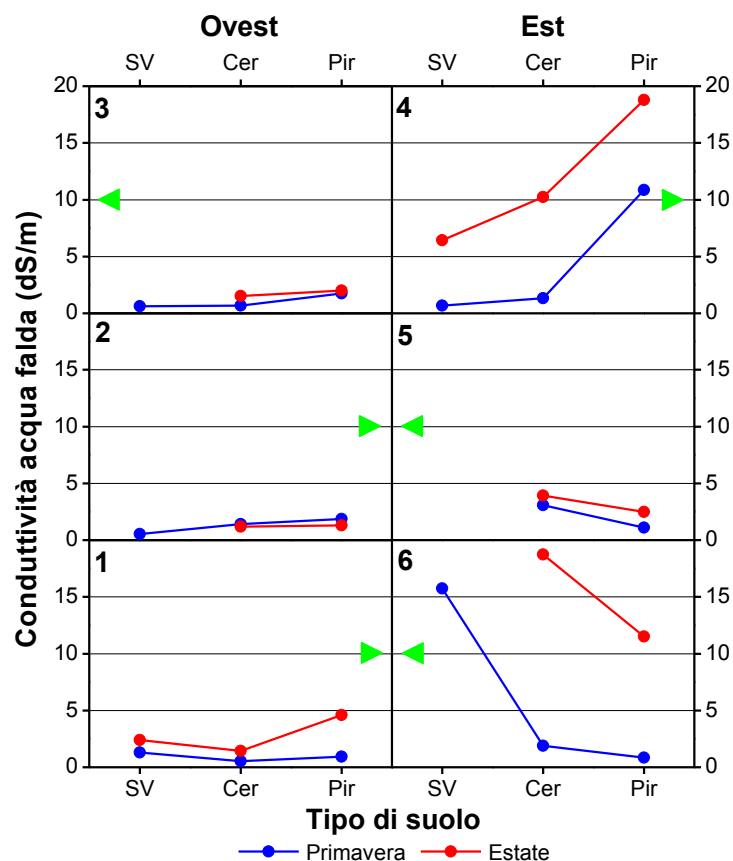


Fig.3.29 Andamento della conduttività elettrica lungo i sei transetti campionati in primavera (blu) ed estate (rosso). Valori misurati in corrispondenza del punto di prelievo B di ogni stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Pialassa Baiona rispetto al transetto.

### pH dell'acqua di falda

Come si può osservare dall'andamento mostrato nel grafico in Fig. 3.30, i valori di pH si distribuiscono intorno ai valori 7-8. Non si evidenziano differenze significative tra le zone nei diversi transetti. Solo nel transetto 6 si può notare una variazione di pH tra la primavera e l'estate. Come già accennato al riguardo della conduttività elettrica, in molti casi la elevata profondità della falda in corrispondenza delle stazioni San Vitale, anche se ancora misurabile, non ha permesso di raccogliere un campione

d'acqua attendibile e quindi di valutarne le caratteristiche chimiche. Non si è quindi ritenuto opportuno applicare test statistici.

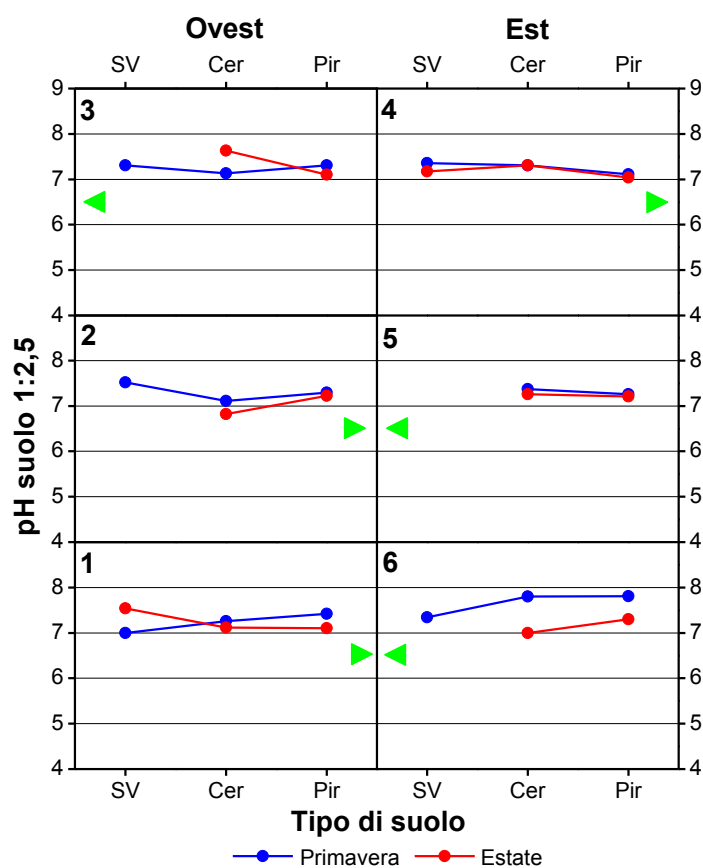


Fig.3.30. Andamento del pH della falda lungo i sei transetti campionati in primavera (blu) ed estate (rosso). Valori misurati in corrispondenza del punto di prelievo B di ogni stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Pialassa Baiona rispetto al transetto.

### **3.3.2 Caratteristiche chimiche dei suoli misurate in tutti i campioni: conduttività elettrica (CE), pH e contenuto in acqua**

I valori di CE, pH e contenuto d'acqua determinati su tutti i campioni di suolo prelevati in corrispondenza dei sei transetti mostrano un *range* di variazione rispettivamente in primavera tra 0.07 e 1.62 dS/m per la CE, tra 4.8 e 8.6 per il pH e tra 10.21% e 218.51% per il contenuto d'acqua, mentre per l'estate tra 0.09 e 2.33 dS/m per la CE, tra 4.7 e 8.8 per il pH e tra 6.30% e 119.73% per il contenuto d'acqua (in entrambi i casi, valori così elevati per il contenuto in acqua sono possibili perché determinati su campioni contenenti anche la lettiera, composta da materiale organico leggero e con grande capacità di adsorbire acqua).

A seguire sono riportate in dettaglio le osservazioni relative a ciascuna caratteristica chimica.

#### **Conduttività elettrica del suolo**

La conduttività elettrica (Fig. 3.19) si presenta più elevata nei suoli di tipo Pirottolo rispetto ai San Vitale e ai Cerba. Il fattore pedotipo risulta statisticamente significativo al test dell'analisi della varianza (Tab. 3.11). È significativo anche il fattore transetto, ma non'è possibile dimostrare una differenza sistematica tra i transetti della zona est e i transetti della zona ovest (fattore zona e interazione stagione×zona non significativo). E' possibile rilevare un aumento della conduttività elettrica in estate (fattore stagione significativo), molto leggero in alcuni casi, più evidente in altri. L'interazione pedotipo×transetto è al limite della significatività. La presenza di questa interazione indicherebbe che le differenze di conduttività tra i pedotipi variano, come entità tra i diversi transetti. Per il periodo di campionamento considerato, si arriva ad un suolo marcatamente salinizzato solo nella stazione 4PIR (zona est), in estate. Anche se, in media, la conduttività della zona est è più elevata rispetto alla zona ovest questa differenza non risulta statisticamente significativa perché è essenzialmente dovuta a quest'unica stazione e le differenze all'interno di ciascuna delle due zone sono rilevanti. Nel caso di 2PIRBe il dato originale è stato considerato un outlier perché presentava un valore di conduttività piuttosto elevato rispetto agli altri, pari ai valori che si riscontrano nella lettiera, pertanto per le analisi statistiche non è stato

considerato, mentre per il grafico in Fig. 3.19 è stato sostituito dalla media dei valori trasformati in log10 di 2PIRAe e 2PIRCe.

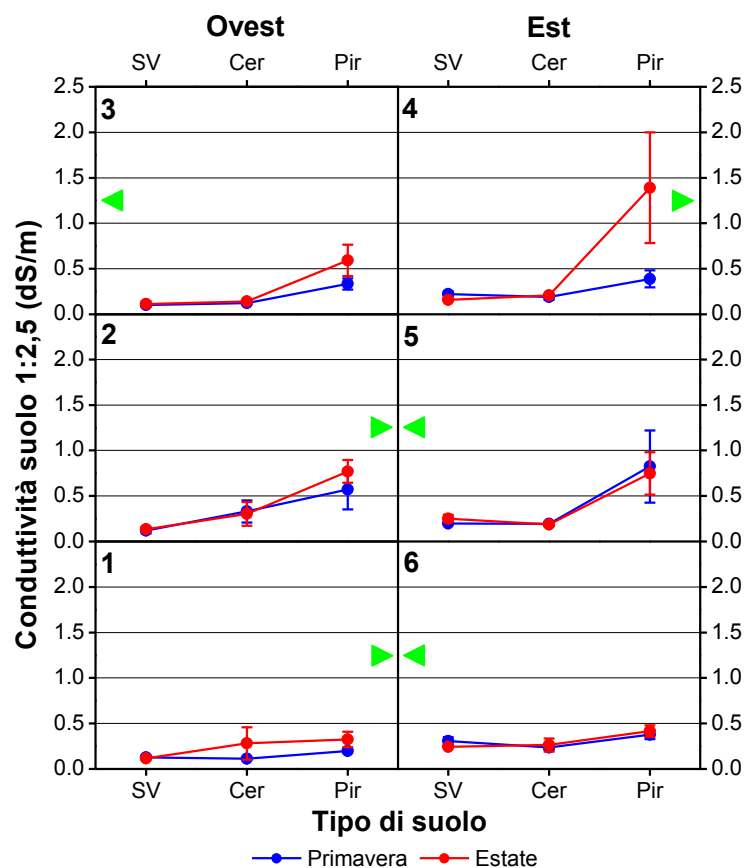


Fig.3.19 Andamento della conduttività elettrica del suolo lungo i sei transetti campionati, in primavera (blu) ed estate (rosso). Media  $\pm$  errore standard dei tre punti di campionamento di ciascuna stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Pialassa Baiona rispetto al transetto.

Tab.3.11 Tavola di ANOVA per la conduttività elettrica del suolo<sup>(a)</sup>. 2PIRBe è stato eliminato dall'analisi (outlier). In rosso i fattori o le interazioni significativi. St=stagione; Zo= zona, Tr= transetto, Pe= pedotipo

<sup>(a)</sup>Trasformazione per l'omogeneità della varianza: logaritmo naturale

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
St	0.74	1	0.74	11.75	0.027
Zo	4.05	1	4.05	5.95	0.071
Tr(Zo)	2.72	4	0.68	3.35	0.014
Pe	23.66	2	11.83	28.16	0.000
StXZo	0.11	1	0.11	1.71	0.261
StXTr(Zo)	0.25	4	0.06	0.31	0.870
StXPe	0.92	2	0.46	2.79	0.120
ZoXPe	1.12	2	0.56	1.33	0.317
PeXTr(Zo)	3.36	8	0.42	2.07	0.050
StXZoXPe	0.01	2	0.00	0.02	0.979
PeXStXTr(Zo)	1.32	8	0.16	0.81	0.597
Residua	14.63	71	0.20		
Totale	52.87	106			

### Reazione del suolo (pH)

La Fig. 3.20 evidenzia che due delle stazioni CER della zona ovest presentano un pH piuttosto basso, mentre i valori delle corrispondenti stazioni SV e PIR sono paragonabili a quelli misurati negli altri transetti. Questo determina un'interazione pedotipo×transetto altamente significativa). Il pH non varia stagionalmente in modo sistematico; i diversi pedotipi si comportano in modo differente (interazione significativa stagione pedotipo Tab.3.12). Analogamente a quanto già detto per la conduttività elettrica, 2PIRBe per le analisi statistiche non è stato considerato perché outlier, mentre per il grafico in Fig. 3.20 è stato sostituito dalla media dei valori trasformati in log10 di 2PIRAe e 2PIRCe.



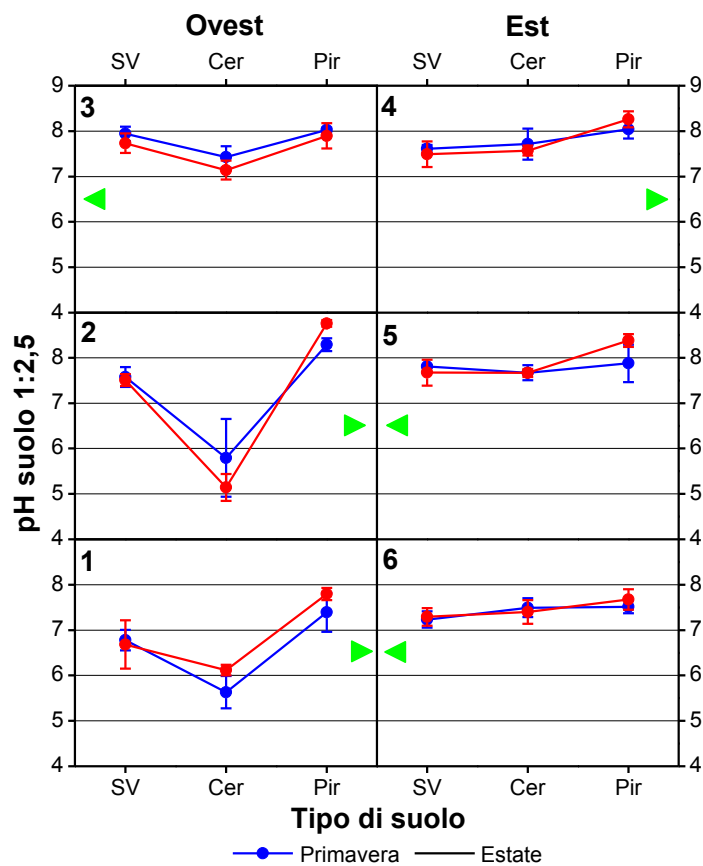


Fig. 3.20 Andamento del pH del suolo lungo i sei transetti campionati, in primavera (blu) ed estate (rosso). Media  $\pm$  errore standard dei tre punti di campionamento di ciascuna stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Pialassa Baiona rispetto al transetto.

Tab.3.12 Tavola di ANOVA per la conduttività elettrica del suolo<sup>(a)</sup>. 2PIRBe è stato eliminato dall'analisi (outlier). In rosso i fattori o le interazioni significative. St=stagione; Zo= zona, Tr= transetto, Pe= pedotipo

<sup>(a)</sup>Trasformazione per l'omogeneità della varianza: elevato al cubo

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
St	729.43	1	729.43	0.23	0.656
Zo	102494.50	1	102494.50	1.73	0.258
Tr(Zo)	236453.90	4	59113.48	11.63	0.000
Pe	509374.30	2	254687.20	11.48	0.005
StXZo	578.33	1	578.33	0.18	0.690
StXTr(Zo)	12600.78	4	3150.20	0.62	0.650
StXPe	28540.73	2	14270.37	6.25	0.023
ZoXPe	195358.50	2	97679.24	4.4	0.051
PeXTr(Zo)	177493.40	8	22186.68	4.37	0.000
StXZoXPe	26.48	2	13.24	0.01	0.994
PeXStXTr(Zo)	18277.44	8	2284.68	0.45	0.887
Residua	365937.80	71	5082.47		
Totale	1647866.00	106			

### Contenuto in acqua (%) del suolo

Il contenuto di acqua del suolo (Fig. 3.21) diminuisce in modo evidente in estate rispetto alla primavera, anche se in misura diversa nei diversi transetti (interazione stazione×transetto significativa, Tab. 3.13). Il contenuto in acqua è sempre maggiore nei suoli Pirottolo rispetto agli altri pedotipi, anche se in misura diversa nei diversi transetti (interazione pedotipo×transetto significativa). Nel caso di 2SVBp il dato originale è stato considerato anomalo perché risultava essere ancora più basso del valore più basso registrato in estate. Per questo motivo, per le analisi statistiche non è stato considerato, mentre per il grafico in Fig. 3.19 è stato sostituito dalla media aritmetica dei valori 2SVAp e 2SVCp.

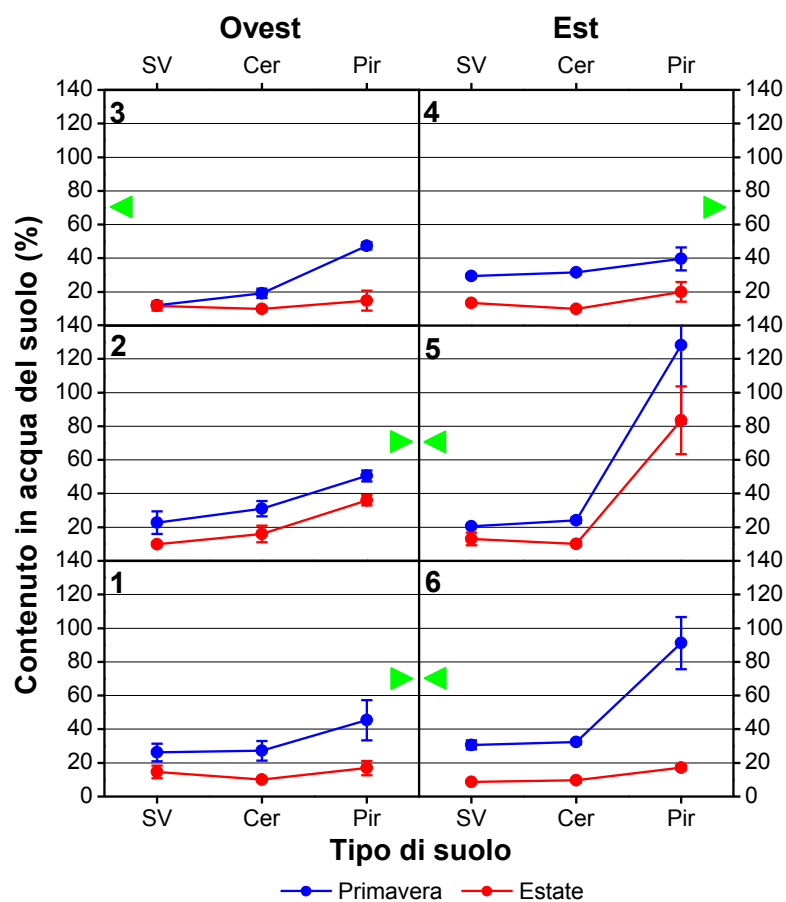


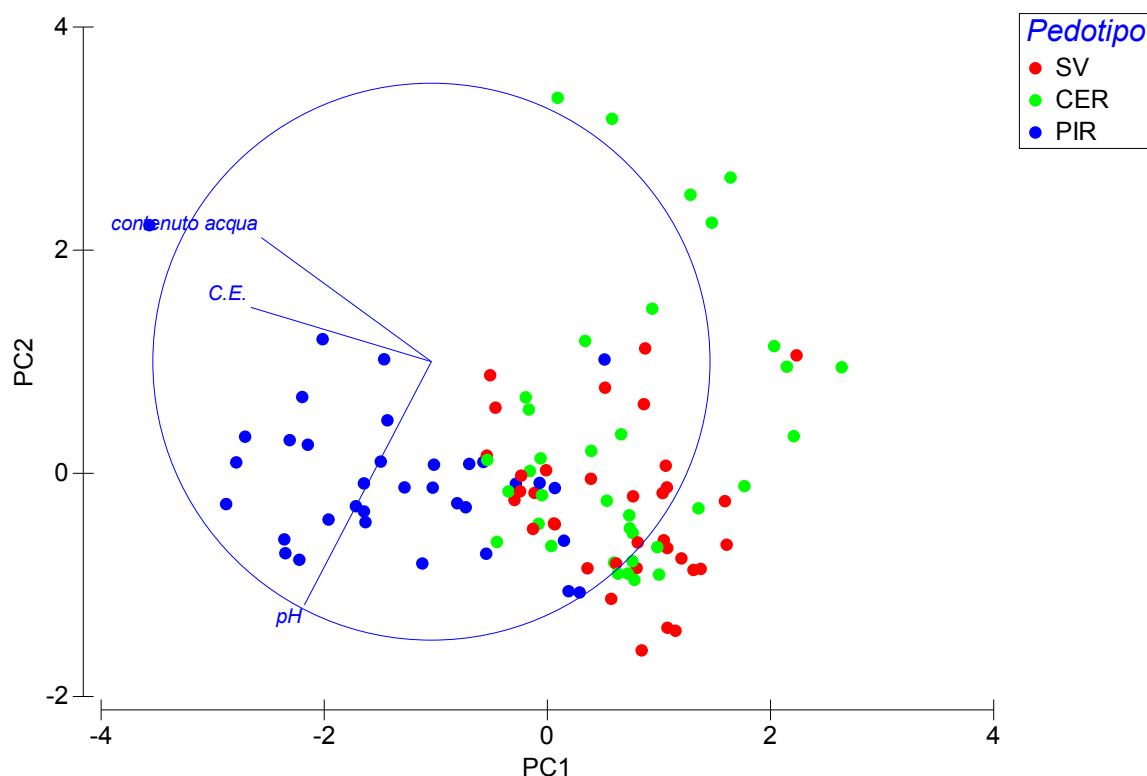
Fig. 3.21 Andamento del contenuto in acqua del suolo lungo i sei transetti campionati, in primavera (blu) ed estate (rosso). Media  $\pm$  errore standard dei tre punti di campionamento di ciascuna stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Pialassa Baiona rispetto al transetto.

Tab.3.13 Tavola di ANOVA per la conduttività elettrica del suolo<sup>(a)</sup>. 2SVBp è stato eliminato dall'analisi. In rosso i fattori o le interazioni significative.  
St=stagione; Zo= zona, Tr= transetto, Pe= pedotipo

<sup>(a)</sup>Trasformazione per l'omogeneità della varianza: logaritmo naturale

Sorgente di variazione	SS	DF	MS	F	P
St	19.07	1	19.07	50.33	0.002
Zo	1.09	1	1.09	1.76	0.255
Tr(Zo)	2.47	4	0.62	5.72	0.001
Pe	16.42	2	8.21	12.48	0.004
StXZo	0.38	1	0.38	1.01	0.372
StXTr(Zo)	1.52	4	0.38	3.51	0.011
StXPe	0.34	2	0.17	0.9	0.443
ZoXPe	0.77	2	0.39	0.59	0.577
PeXTr(Zo)	5.26	8	0.66	6.09	0.000
StXZoXPe	0.14	2	0.07	0.37	0.704
PeXStXTr(Zo)	1.50	8	0.19	1.74	0.104
Residua	7.77	71	0.11		
Totale	56.73	106			

Le differenze presenti tra campioni per quanto riguarda le caratteristiche appena discusse possono essere visualizzate attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA). Nella Fig. 3.23 è riportato il diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCA a tutti i campioni raccolti, considerando come variabili la conduttività elettrica, il pH e il contenuto d'acqua del suolo. In questa PCA si vuol mettere in evidenza la relazione tra le variabili considerate ed i pedotipi presenti nella Pineta. I campioni appartenenti ai pedotipi Pirottolo, Cerba e San Vitale sono stati contrassegnati usando tre colori diversi.



*Fig 3.23 Diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCA a tutti i campioni raccolti, considerando come variabili la CE, il pH e il contenuto d'acqua del suolo.*

La qualità globale della rappresentazione dei campioni, in relazione alle variabili ambientali analizzate, nel piano definito dalle PC1 e PC2, è molto buona (spiega il 92,3 % della variazione totale). Tale risultato era in buona parte atteso, dal momento che il numero di variabili di partenza si presentava molto basso. La PC1 risulta nettamente la più importante, in quanto spiega quasi il 60% della variazione totale.

Osservando i valori dei coefficienti delle combinazioni lineari che definiscono le prime due PC (Tab. 3.15), risulta che le variabili CE e contenuto d'acqua contribuiscono (con segno positivo) in misura preponderante al primo asse (PC1), mentre la variabile pH contribuisce (con segno negativo) in misura prevalente al secondo asse (PC2).

La qualità globale della rappresentazione dei campioni, in relazione alle variabili ambientali analizzate, nel piano definito dalle PC1 e PC2, è buona (spiega l'82,5% della variazione totale). Tale risultato era in buona parte atteso, dal momento che il

numero di variabili di partenza si presentava molto basso. La PC1 spiega quasi il 54,2% della variazione totale.

Osservando i valori dei coefficienti delle combinazioni lineari che definiscono le prime due PC (Tab. 3.14), risulta che le variabili CE e contenuto d'acqua contribuiscono in misura preponderante al primo asse (PC1), mentre la variabile pH contribuisce in misura prevalente al secondo asse (PC2).

Graficamente, in Fig. 3.23, i suoli PIR (in azzurro) per le caratteristiche considerate si presentano più omogenei tra loro e sono ben distinti dai suoli CER e SV che invece si presentano più mescolati e quindi eterogenei tra loro.

Alcuni campioni dei suoli CER (in verde) si distinguono invece dal resto della distribuzione dei punti perché presentano valori elevati sulla PC2. Contribuendo la variabile pH in misura prevalente al secondo asse (PC2), come possiamo vedere in Tab. 3.14, questo sta a significare che presentano pH più basso rispetto a tutti gli altri.

*Tab. 3.14 Valori dei coefficienti associati alle variabili conduttività elettrica (CE) pH e contenuto d'acqua nelle combinazioni lineari che definiscono le prime due componenti principali.*

Variabile	PC1	PC2
Conduttività Elettrica	-0.648	0.195
pH	-0.456	-0.874
Contenuto d'acqua	-0.610	-0.655

### 3.3.3 Caratteristiche chimiche e fisiche del suolo valutate sui campioni nei punti B

In Tab. 3.15 è riportato un quadro riassuntivo di alcune caratteristiche chimico fisiche relative ai campioni B, prelevati in corrispondenza dei tre pedotipi (San Vitale, SV; Cerba, CER; Pirottolo, PIR) lungo ciascun transetto.

*Tab 3.15 Caratteristiche chimico fisiche degli orizzonti A relativi ai campioni B.*

Profilo	Prof.	Sabbia 2 - 0.05 mm	Limo 0.05 - 0.002 mm	Argilla < 0.002 mm	Tessitura	TOC	TKN	C/N
	cm	g/kg	g/kg	g/kg	USDA	g/kg	g/kg	
1SVB	0 - 25	871	71	58	SF	13,4	1,1	12
1CERB	0 - 12	861	79	60	SF	19,2	1,6	12
1PIRB	0 - 17	746	159	95	FS	23,5	2,5	9
2SVB	0 - 12	886	67	47	S	9,2	0,9	10
2CERB	0 - 13	823	100	76	SF	24,7	1,7	14
2PIRB	0 - 10	784	129	87	FS	54,0	5,4	10
3SVB	0 - 10	892	63	45	S	10,2	0,9	11
3CERB	0 - 10	886	57	58	S	16,8	1,4	12
3PIRB	0 - 10	641	214	144	FS	52,6	3,9	14
4SVB	0 - 20	868	69	64	SF	29,6	1,9	15
4CERB	0 - 15	836	106	57	SF	39,7	3,3	12
4PIRB	0 - 10	874	75	51	SF	36,4	3,5	10
5SVB	0 - 16	886	63	51	S	15,5	1,3	12
5CERB	0 - 11	831	106	63	SF	21,5	1,9	11
5PIRB	0 - 10	817	107	76	SF	29,9	3,0	10
6SVB	0 - 10	814	129	57	SF	29,8	2,0	15
6CERB	0 - 10	831	106	63	SF	19,0	1,6	12
6PIRB	0 - 10	771	147	82	FS	97,0	6,4	15

Per queste variabili, nei test statistici condotti mediante ANOVA è assente il fattore stagione, in quanto le caratteristiche sono state misurate solo per il campionamento primaverile. Inoltre, poiché esiste una sola osservazione per cella (cioè per ciascuna

stazione) non si può valutare l'interazione del pedotipo con il transetto,  $\text{pedotipo} \times \text{transetto}(\text{zo})$ , che viene di fatto assunta come assente.

### Limo ed argilla

Come è possibile osservare dal grafico in Fig 3.24, il contenuto di elementi a granulometria più fine (limo e argilla) in generale aumentano passando da San Vitale a Cerba a Pirtottolo, infatti il fattore pedotipo risulta significativo. Non ci sono differenze sistematiche tra zone. Non si evidenziano differenze significative neanche tra transetti.

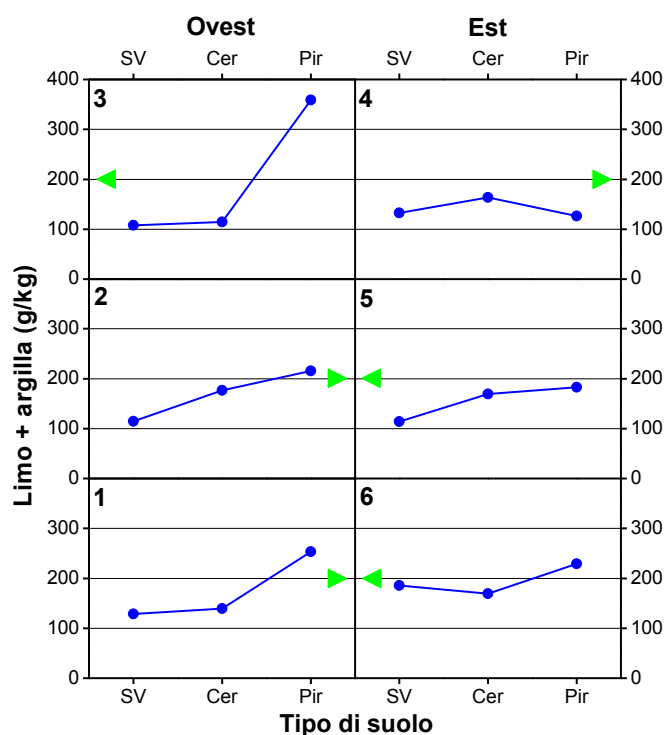


Fig. 3.24 Andamento del contenuto di limo ed argilla lungo i sei transetti campionati. I dati sono relativi ai soli punti di prelievo B in ogni stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Pialassa Baiona rispetto al transetto.



Tab 3.16 Tavola di ANOVA per il contenuto di argilla e limo<sup>(a)</sup>. In rosso i fattori o le interazioni significativi.

Zo= zona, Tr= transetto, Pe= pedotipo

<sup>(a)</sup>Trasformazione per l'omogeneità della varianza: log10

Sorgente di variazione	df	SS	MS	F	P
Zo	1	5.8E-04	6E-04	7.24E-02	0.796
<b>Pe</b>	<b>2</b>	<b>1.6E-01</b>	<b>8E-02</b>	<b>8.8654</b>	<b>0.010</b>
Tr(Zo)	4	3.2E-02	8E-03	0.88047	0.517
ZoxPe	2	7.2E-02	4E-02	3.9573	0.063
Residua	8	7.3E-02	9E-03		
Totale	17	3.4E-01			

### TOC (contenuto di carbonio organico)

Come si può vedere dalla rappresentazione grafica in Fig. 3.25 il contenuto di carbonio organico in generale aumenta passando da San Vitale a Cerba a Pirottolo. Il fattore pedotipo infatti risulta significativo (Tab. 3.18). Non ci sono differenze sistematiche tra zone. Non si evidenziano differenze significative neanche tra transetti.

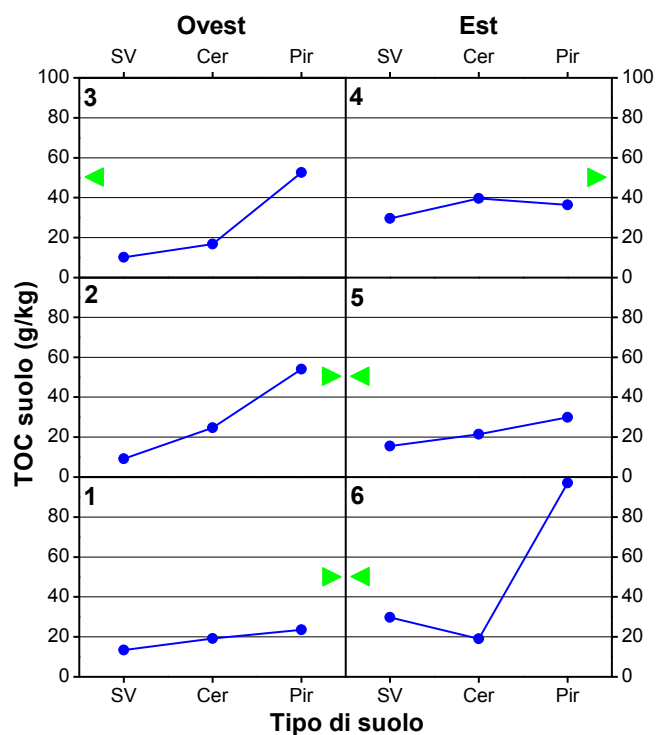


Fig. 3.25 Andamento del contenuto di carbonio organico lungo i sei transetti campionati. I dati sono relativi ai soli punti di prelievo B in ogni stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Piasa Baiona rispetto al transetto.

Tab 3.17 Tavola di ANOVA per il contenuto di carbonio organico<sup>(a)</sup>. In rosso i fattori o le interazioni significative.  
Zo= zona, Tr= transetto, Pe= pedotipo

<sup>(a)</sup>Trasformazione per l'omogeneità della varianza: log10

Sorgente di variazione	df	SS	MS	F	P
Zo	1	0.13	0.13	4.349	0.205
Pe	2	0.59	0.30	9.331	0.009
Tr(Zo)	4	0.12	0.03	0.968	0.475
ZoxPe	2	0.07	0.03	1.104	0.372
Residua	8	0.25	0.03		
Totale	17	1.17			

### Rapporto carbonio e azoto (C/N)

Il rapporto carbonio azoto (C/N) varia entro un ambito senza particolari trend né in funzione della zona né del pedotipo come è possibile osservare in Fig. 3.26 e in Tab. 3.18. Nessuno dei fattori infatti risulta statisticamente significativo.

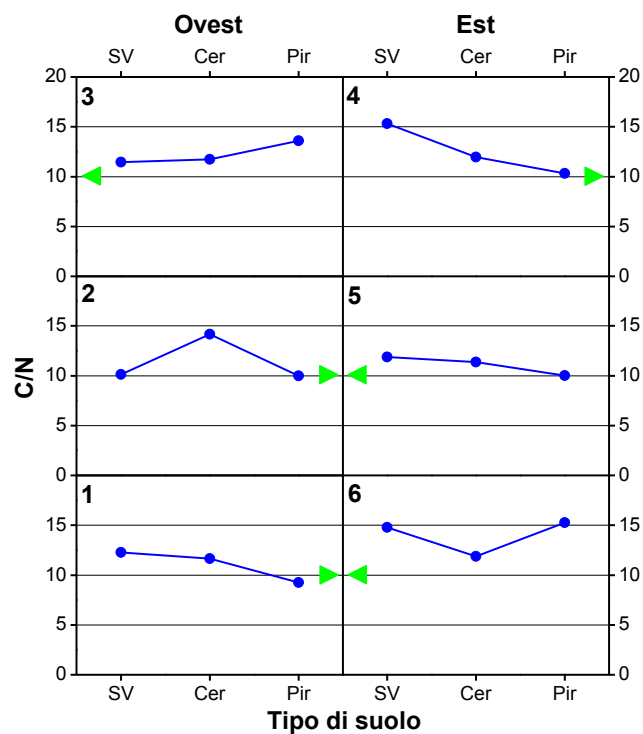


Fig. 3.26 Andamento del contenuto di carbonio e azoto (C/N) lungo i sei transetti campionati. I dati sono relativi ai soli punti di prelievo B in ogni stazione. Le frecce verdi indicano la direzione est e quindi la posizione della Pialassa Baiona rispetto al transetto.

Tab 3.18 Tavola di ANOVA per rapporto carbonio e azoto (C/N)<sup>(a)</sup>. In rosso i fattori o le interazioni significativi.

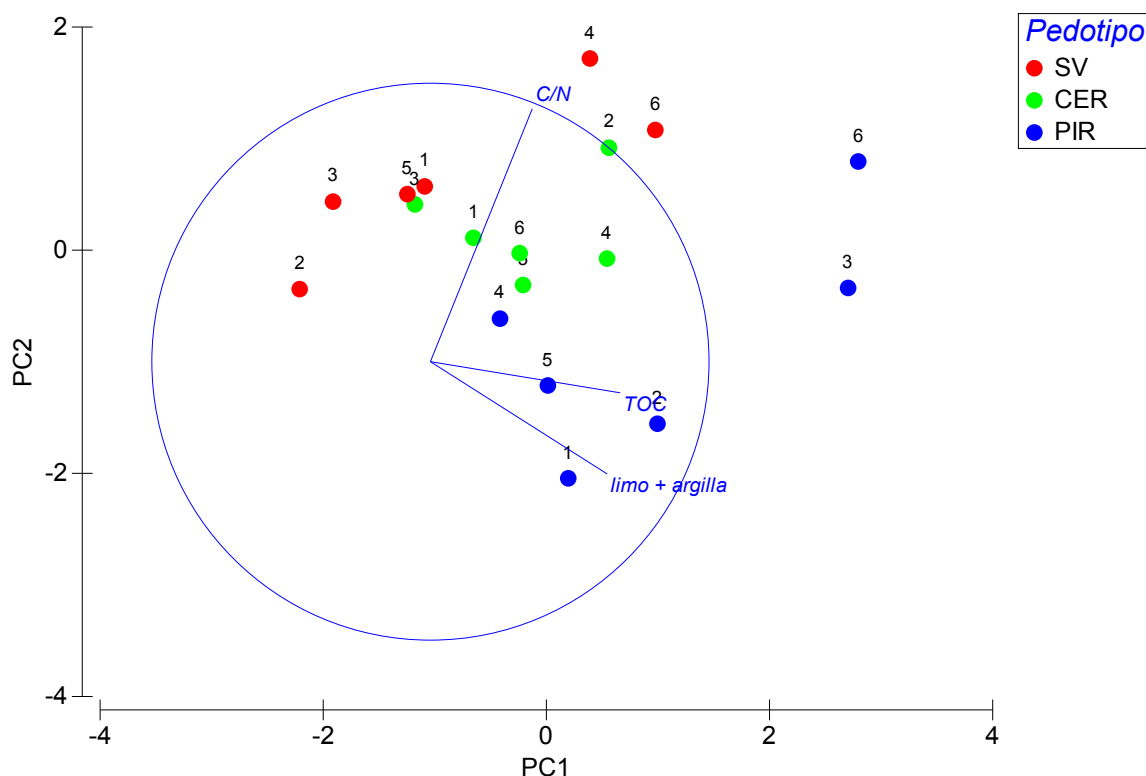
Zo= zona, Tr= transetto, Pe= pedotipo

Sorgente di variazione	df	SS	MS	F	P
Zo	1	5E-03	5E-03	1.07	0.401
Pe	2	7E-03	4E-03	0.83	0.456
Tr(Zo)	4	2E-02	5E-03	1.08	0.417
ZoxPe	2	1E-02	5E-03	1.24	0.336
Residua	8	3E-02	4E-03		
Totale	17	7E-02			

Nella Fig. 3.27 è riportato il diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCA a tutti i campioni raccolti (primavera), considerando come variabili il contenuto di limo più l'argilla, il contenuto di carbonio organico (TOC) ed il rapporto carbonio e azoto (C/N). I campioni appartenenti ai tre pedotipi sono stati contrassegnati usando tre colori diversi.

La qualità globale della rappresentazione dei campioni, in relazione alle variabili ambientali analizzate, nel piano definito dalle PC1 e PC2, è molto buona (spiega il 91,3 % della variazione totale). Anche in questo caso il risultato era atteso, a causa del basso numero di variabili. La PC1 risulta nettamente la più importante, in quanto spiega più del 60% della variazione totale.

Osservando i valori dei coefficienti delle combinazioni lineari che definiscono le prime due PC (Tab. 3.19), risulta che le variabili limo + argilla e TOC contribuiscono (con segno positivo) in misura preponderante al primo asse (PC1), mentre la variabile C/N contribuisce in misura prevalente al secondo asse (PC2).



*Fig. 3.27 Diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCA a tutti i campioni raccolti, considerando come variabili il rapporto carbonio e azoto (C/N), il contenuto di carbonio organico e il contenuto di limo + argilla.*

Graficamente, in Fig. 3.27, i suoli PIR (in azzurro), i suoli CER (in verde) ed i suoli SV (in rosso) si presentano omogenei tra loro. Ciascun pedotipo, infatti, presenta caratteristiche omogenee per quello che riguarda le tre variabili considerate. In particolare, i suoli Pirottolo del transetto 3 e del transetto 6 che si dispongono alla destra nel grafico presentano un maggior contenuto di limo + argilla e TOC, come si può vedere nella Tab. 3.19 in cui entrambe le variabile contribuiscono (con segno positivo) al primo asse (PC1).

Se si osserva, invece, verso la parte sinistra nel grafico, si può notare che i suoli di tipo SV, in particolare dei transetti 4 e 6, presentano un maggior contenuto di carbonio e azoto. La variabile C/N, infatti, contribuisce in maniera molto importante (con segno positivo) al secondo asse (PC2).

*Tab. 3.19 Valori dei coefficienti associati alle variabili limo + argilla, TOC e C/N nelle combinazioni lineari che definiscono le prime due componenti principali.*

Variabile	PC1	PC2
Limo + argilla	0.635	-0.403
TOC	0.681	-0.112
C/N	0.366	0.908

### **3.3.4 Composizione del popolamento, valori dell'indice QBS-ar max e classi di qualità del suolo**

In appendice sono riportate le tabelle (dalla T1 alla T18) di QBS-ar max rispettive dei campioni primaverili, in cui sono riportati i taxa di microartropodi del suolo con i relativi EMI rinvenuti nei nove campioni considerati per ciascun transetto e le relative densità numeriche (numero di individui per campione). In ciascuna colonna sono inoltre indicate i valori dell'indice QBS-ar, riassuntivi di ciascuna replica, associati ad ogni stazione. Sempre in appendice, dalla Tab. T19 alla Tab. T36 sono riportate le tabelle QBS-ar max relative ai campioni estivi.

Applicando il sistema di valutazione descritto da Parisi (2001) e in seguito modificato da D'Avino (2002), sulla base dei valori di QBS-ar max ottenuti, sono state definite le classi di qualità del suolo per i sei transetti primaverili e per i sei transetti estativi, riportate nella Tab. 3.42 e Tab. 3.43.

Tab.3.42 Classi di qualità dei suoli esaminati nei sei transetti primaverili.

Zona	Transetto		Pedotipo	
		San Vitale	Cerba	Pirottolo
Ovest	1	5	6	6
	2	6	5	3
	3	4	6	6
Est	4	6	6	6
	5	6	6	6
	6	6	6	5

Tab.3.43 Classi di qualità dei suoli esaminati nei sei transetti estivi.

Zona	Transetto		Pedotipo	
		San Vitale	Cerba	Pirottolo
Ovest	1	6	6	6
	2	6	7	6
	3	6	7	6
Est	4	6	6	6
	5	6	6	6
	6	6	6	6

Per quello che riguarda il periodo di campionamento primaverile, la qualità biologica dei suoli risulta buona in molte stazioni, infatti, considerando la divisione in classi, ben 13 stazioni su 18 raggiungono la classe 6.

Le altre stazioni presentano valori corrispondenti alla classe 3 (stazione 2PIR), classe 4 (stazione 3SV) e classe 5 (stazioni 1SV, 2CER e 6PIR).

Considerando i valori numerici dell'indice QBS-ar, la maggior parte dei punti di campionamento raggiunge un punteggio superiore a 100. Solo tre stazioni, tutte appartenenti alla zona ovest (2SV, 3SV e 2PIR) assumono valori inferiori a 100.

Si osserva così una certa differenza tra le due zone considerando l'insieme delle stazioni: la zona ovest ha una qualità biologica media dei suoli un po' inferiore rispetto a quella dei suoli della zona est.

Nel periodo estivo la qualità biologica dei suoli migliora in molte stazioni, infatti, considerando la divisione in classi, ben 16 stazioni su 18 raggiungono la classe 6. In particolare si ha un miglioramento delle stazioni 2PIR, 3SV, 1SV, 2CER e 6 PIR che in primavera registravano valori fino a due punti più bassi.

Le stazioni 2CER e 3 CER raggiungono addirittura la classe 7.

Considerando i valori numerici dell'indice QBS-ar la maggior parte dei punti di campionamento raggiunge in estate un punteggio superiore a 200.

Contrariamente a quello che si verifica in primavera i valori di qualità più elevati sono stati osservati nella zona ovest (stazioni 2CER e 3CER)

### **3.3.5 Analisi multivariata della struttura del popolamento**

La Fig. 3.31, riporta il diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCO a tutti i punti di campionamento sulla base dell'abbondanza dei taxa di microartropodi. La prima coordinata principale (PCO1) rappresenta il 33,6% della variazione totale e la seconda (PCO2) il 14,7%. La quantità di variazione rappresentata dall'insieme delle due coordinate principali è quindi piuttosto contenuta, corrispondente al 48,3% della variazione totale. Tale risultato può essere spiegato dal numero elevato di variabili esaminate e dalla loro scarsa correlazione reciproca. Inoltre, la Fig.3.31 illustra la disposizione dei campioni (punti) sul piano di ordinamento, identificati in base ai fattori stagione e zona. In blu (primavera Est) e azzurro (primavera Ovest) sono indicati i campioni primaverili che nel grafico



sono disposti sulla destra e si distribuiscono in maniera separata rispetto a quelli estivi che si dispongono sulla sinistra di colore rosso (estate est) ed arancio (estate Ovest). E' da notare, inoltre, che in primavera i campioni appartenenti al transetto Est (in alto a destra) si dispongono abbastanza separati da quelli Ovest (in basso a destra). In estate, invece, i campioni est e Ovest sono ampiamente sovrapposti. Quanto affermato si vede ancora più chiaramente nella PCA dei centroidi. Campioni che nel grafico tendono a stare vicini tra loro presentano una struttura di popolamento simile (i diversi taxa sono presenti con abbondanze simili). Campioni lontani tra loro, invece, mostrano una struttura di popolamento differente (i taxa sono presenti con abbondanze diverse o i taxa presenti in un campione sono assenti nell'altro).

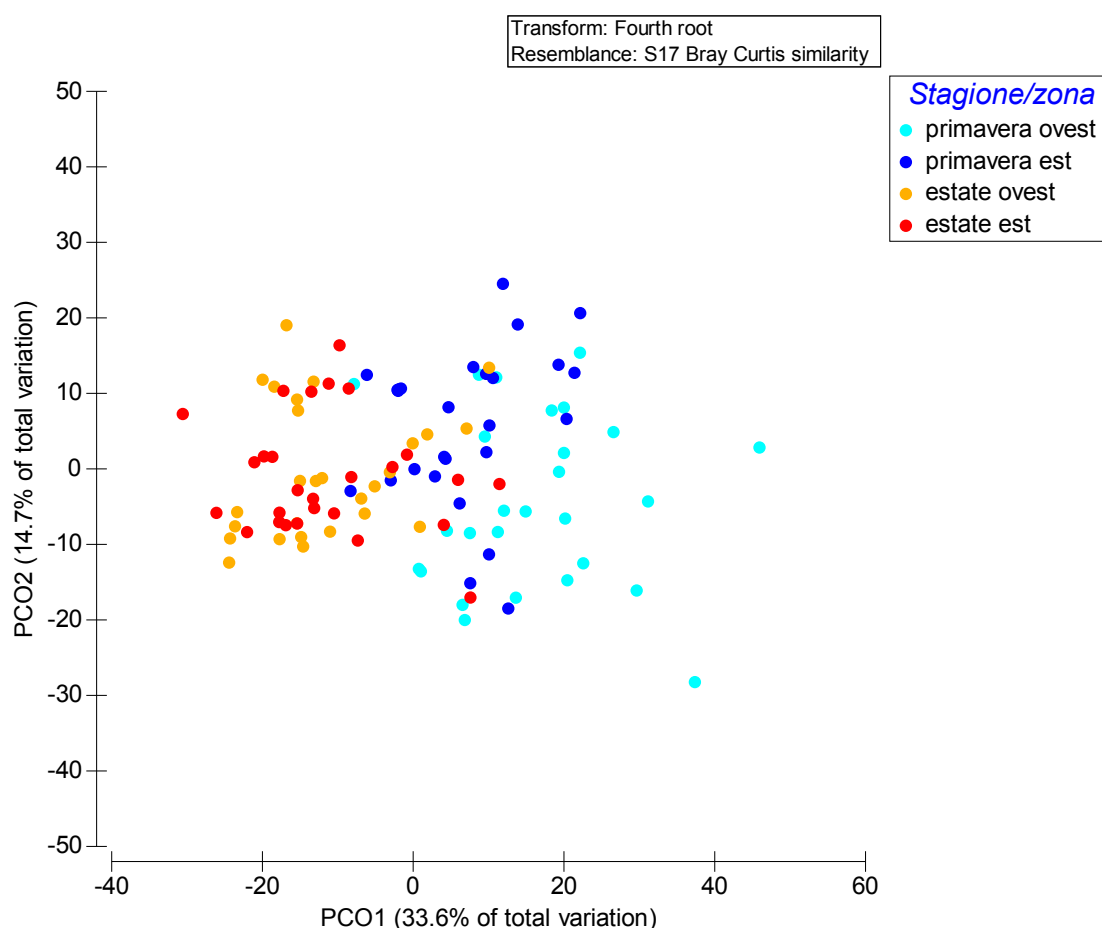
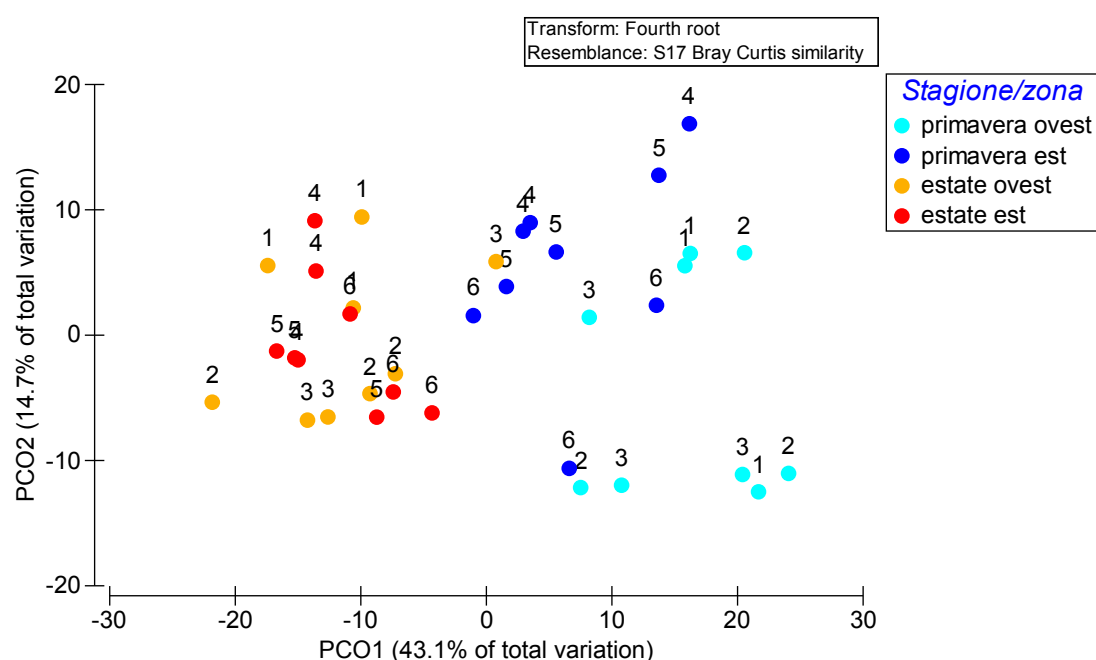


Fig. 3.31 Diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCO a tutti i punti di campionamento sulla base dell'abbondanza dei taxa di microartropodi.

Per una visione più completa viene riportato il diagramma PCO dei centroidi di stazione sulla base dell'abbondanza dei taxa di microartropodi. In questo diagramma è presente anche il numero che sta ad indicare il transetto a cui la stazione appartiene. (Fig. 3.32). La prima coordinata principale (PCO1) rappresenta il 43,1% della variazione totale e la seconda (PCO2) il 14,7%. Tab 3.45. Emerge dunque che la variazione rappresentata dall'insieme delle due coordinate principali sia piuttosto consistente, corrispondente al 63% della variazione totale.



*Fig. 3.32 Diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCO dei centroidi di stazione sulla base dell'abbondanza dei taxa di microartropodi. Il numero indica il transetto a cui la stazione appartiene.*

Anche qui come in Fig. 3.31 In blu (primavera Est) e azzurro (primavera Ovest) sono indicati i campioni primaverili che nel grafico si può osservare essere quasi in netta separazione tra loro: è possibile affermare quindi che c'è una differenza marcata tra zone, queste infatti mostrano una struttura di popolamento differente (i taxa sono presenti con abbondanze diverse o i taxa presenti in un campione sono assenti nell'altro). Qui di seguito sono riportati i diagrammi in Fig. 3.33 e in Fig. 3.34 ottenuti applicando la PCO dei centroidi rispettivamente solo ai campioni primaverili e poi

solo ai campioni estivi: in questo modo è possibile effettuare una riflessione più dettagliata sui pedotipi considerando il fattore stagione.

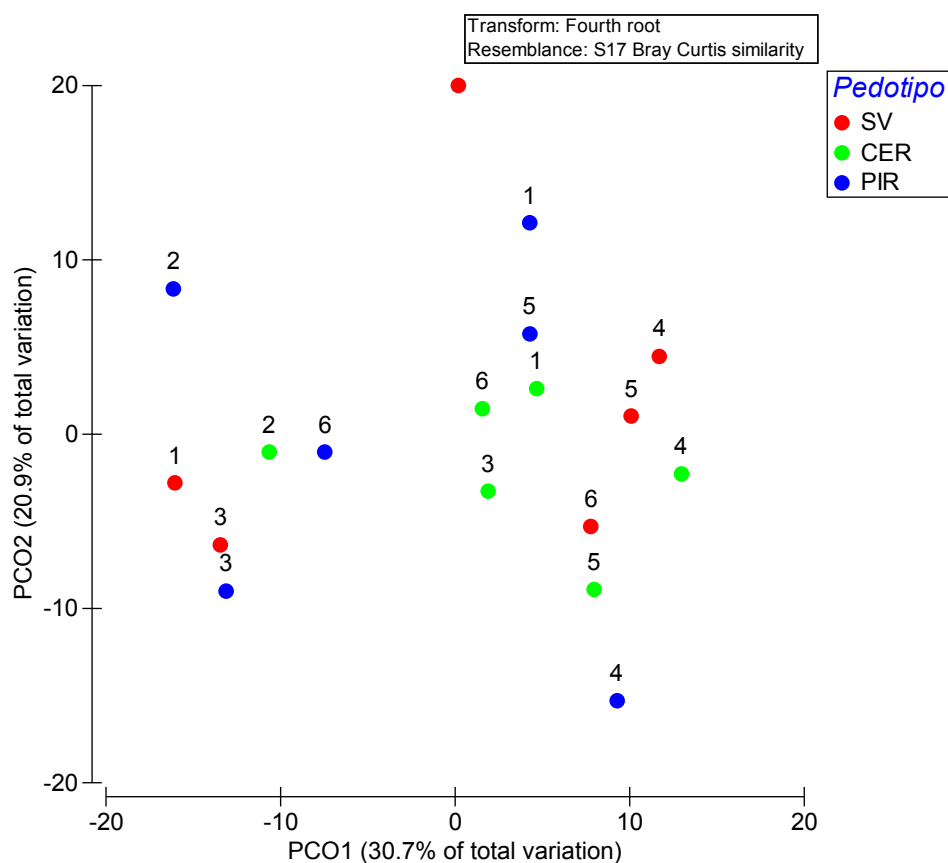


Fig. 3.33 Diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCO dei centroidi solo dei campioni primaverili. Il numero indica il transetto a cui la stazione appartiene; i diversi colori rappresentano i tre pedotipi.

In Fig. 3.33 la prima coordinata principale (PCO1) rappresenta il 30,7% della variazione totale e la seconda (PCO2) il 20,8%. La quantità di variazione rappresentata dall'insieme delle due coordinate principali è quindi pari al 51,5% della variazione totale.

E' possibile osservare che non c'è una netta separazione tra pedotipi però la maggior parte dei suoli PIR (in blu nel grafico in alto a sinistra) tranne il 4PIR ed i suoli CER sono disposti in maniera abbastanza concentrata (soprattutto lungo PCO2).

Si può affermare, quindi, che i pedotipi PIR e CER, in primavera, presentano una struttura di popolamento simile (i diversi taxa sono presenti con abbondanze simili).

I suoli di tipo SV, invece, sembrano il gruppo meno omogeneo anche se quelli appartenenti alla zona est tendono ad aggregarsi nella zona destra nel grafico e quindi si presentano con caratteristiche più simili tra loro.

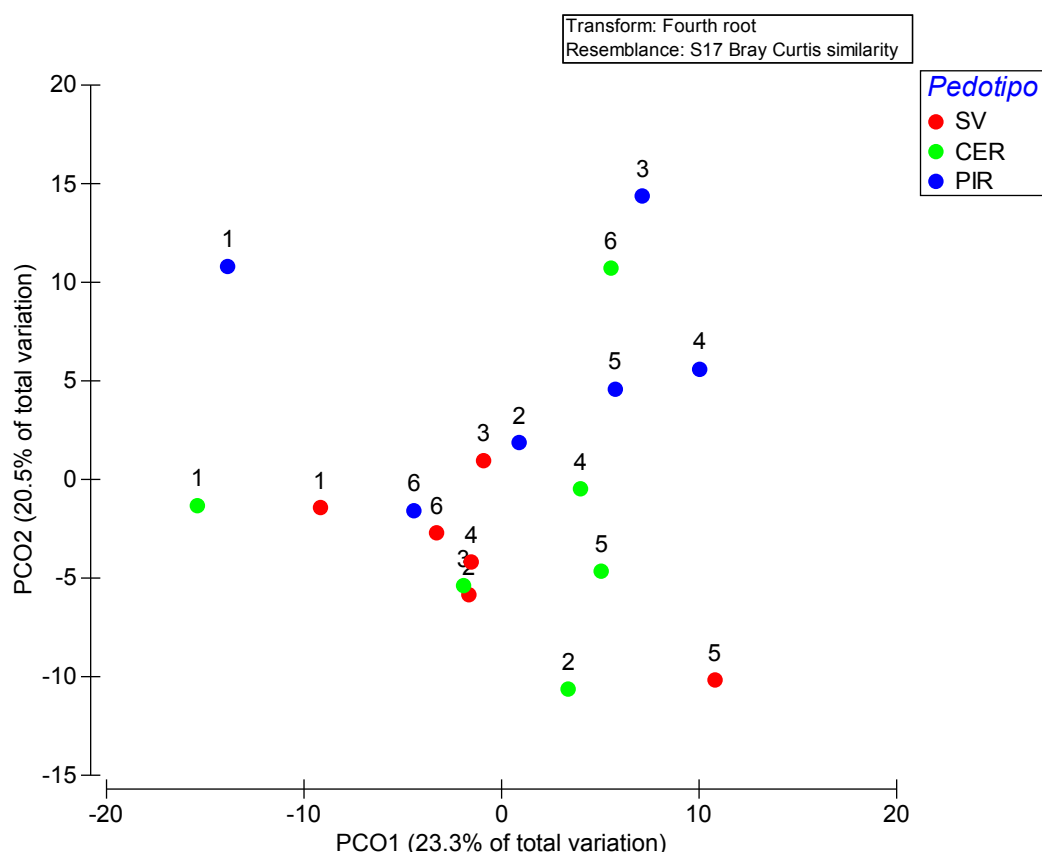


Fig. 3.34 Diagramma di ordinamento ottenuto applicando la PCO dei centroidi solo dei campioni estivi. Il numero indica il transetto a cui la stazione appartiene; i diversi colori rappresentano i tre pedotipi.

In Fig. 3.34 la prima coordinata principale (PCO1) rappresenta il 23,3% della variazione totale e la seconda (PCO2) il 20,5%. La quantità di variazione rappresentata dall'insieme delle due coordinate principali è quindi pari al 43,8% della variazione totale. Com'è possibile osservare dal diagramma, in estate c'è maggior

separazione tra pedotipi rispetto alla primavera, i suoli PIR (in blu) sono infatti tutti aggregati nella parte alta del grafico.

In base ai diagrammi fin'ora esposti si è visto che sia la stagione che la zona che il pedotipo, influiscono sulle caratteristiche dei campioni. A questo punto si è voluto ulteriormente indagare su quale di questi fattori avesse maggior influenza nella sorgente di variazione tra campioni.

Le Tab. 3.46 e 3.47 riportano i risultati della PERMANOVA. Il livello di probabilità per il fattore stagione è 0,0022. Risulta significativa l'interazione tra i fattori transetto e pedotipo in entrambi i test, mentre non risulta significativa l'interazione tra zona e pedotipo. Per vedere se esistono altre interazioni significative è stato effettuato il pooling (Tab. 3.47). Emerge una interazione significativa tra stagione e zona. Questo significa che la zona Est e zona Ovest rappresentano una sorgente di variazione tra campioni in merito alle due stagioni.

*Tab .3.46 Risultati del test PERMANOVA applicato alle abbondanze dei taxa di micrioartropodi di tutti i campioni dei sei transetti esaminati (in rosso i valori di probabilità che indicano differenze significative).*  
*Stagione = St; Zona = Zo; Transetto = Tr; Pedotipo = Pe*

Sorgente di variazione	df	SS	MS	Pseudo-F	P	permutazioni
St	1	14507	14507	25.75	0.002	9616
Zo	1	2394.9	2394.9	1.75	0.201	10
Pe	2	2327.2	1163.6	1.76	0.077	9940
Tr(Zo)	4	5468.9	1367.2	2.94	0.000	9902
StxZo	1	1661.3	1661.3	2.95	0.090	9703
StxPe	2	1520	760.02	1.22	0.317	9950
ZoxPe	2	2230.7	1115.4	1.69	0.096	9947
StxTr(Zo)	4	2253.1	563.28	1.21	0.242	9904
PexTr(Zo)	8	5275.8	659.48	1.42	0.044	9887
StxZoxPe	2	803.04	401.52	0.64	0.730	9930
StxPexTr(Zo)	8	4996.3	624.54	1.34	0.075	9879
Residua	72	33533	465.73			
Totale	107	76971				

Tab .3.47 Risultati del test PERMANOVA con pooling applicato alle abbondanze dei taxa di micrioartropodi di tutti i campioni dei sei transetti esaminati, dopo che è stato eseguito il pooling delle sorgenti di variazione non significative. (in rosso i valori di probabilità che indicano differenze significative).

Stagione = St; Zona = Zo; Transetto = Tr; Pedotipo = Pe

Sorgente di variazione	df	SS	MS	Pseudo-F	P	permutazioni
St	1	14507	14507	30.81	0.000	9945
Zo	1	2394.9	2394.9	1.75	0.200	10
Pe	2	2327.2	1163.6	1.76	0.084	9941
Tr(Zo)	4	5468.9	1367.2	2.90	0.000	9899
StxZo	1	1661.3	1661.3	3.53	0.002	9950
ZoxPe	2	2230.7	1115.4	1.69	0.095	9925
PexTr(Zo)	8	5275.8	659.48	1.40	0.045	9879
Pooled(1)	12	7319.4	609.95	1.30	0.065	9841
Pooled(2)	76	35786	470.86			
Totale	107	76971				

In base ai dati ottenuti con l'analisi della PERMANOVA si è verificato che i popolamenti delle due stagioni sono diversi tra loro. I taxa principalmente responsabili di tale differenza sono mostrati in Tab. 3.48 effettuando l'analisi SIMPER.

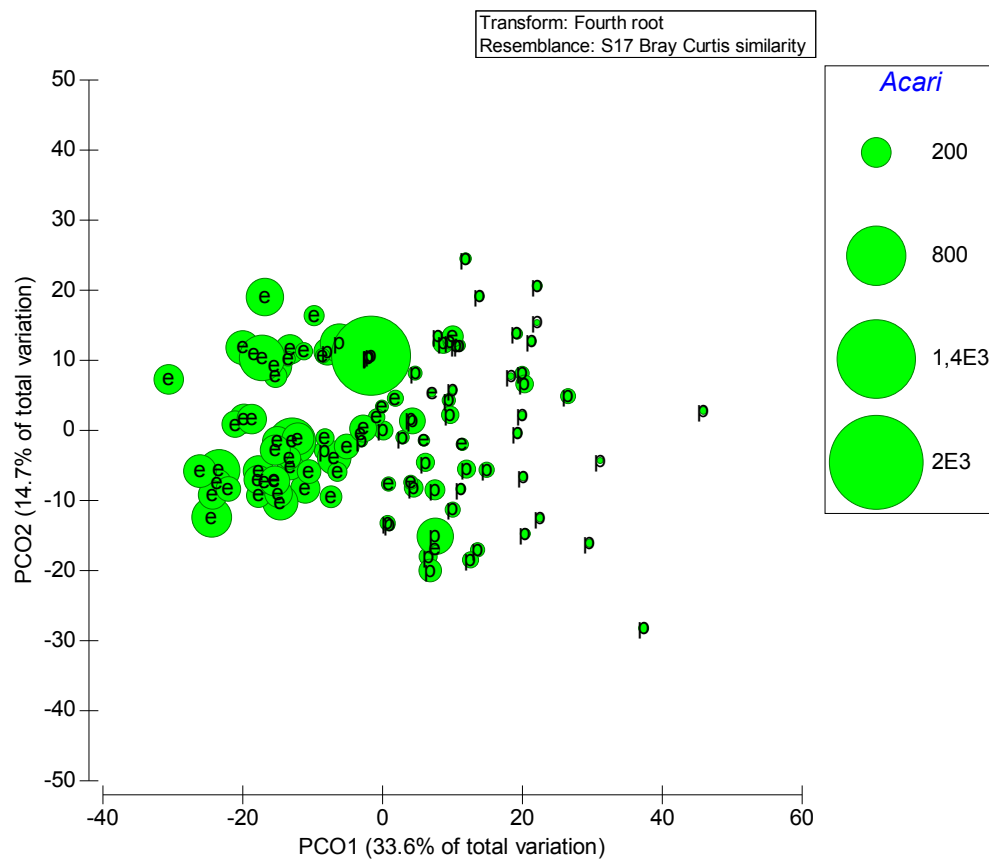
L'analisi SIMPER evidenzia come i maggiori contributi alla dissimilarità tra taxa in primavera ed estate sia riconducibile ad acari, collemboli, pseudoscorpioni, ditteri ed imenotteri.

In particolare si hanno gli acari con un contributo percentuale di 2,64 in primavera e 3,41 in estate, collemboli con un contributo percentuale di 1,98 in primavera e 2,40 in estate, gli pseudoscorpioni con un contributo percentuale di 0,17 in primavera e 1,12 in estate, i diplopodi con un contributo percentuale di 0,80 in primavera e 1,41 in estate ed infine gli imenotteri con un contributo percentuale 0,69 in primavera e 0,97 in estate.

Tab. 3.48 Analisi Simper per tutti i taxa considerati.

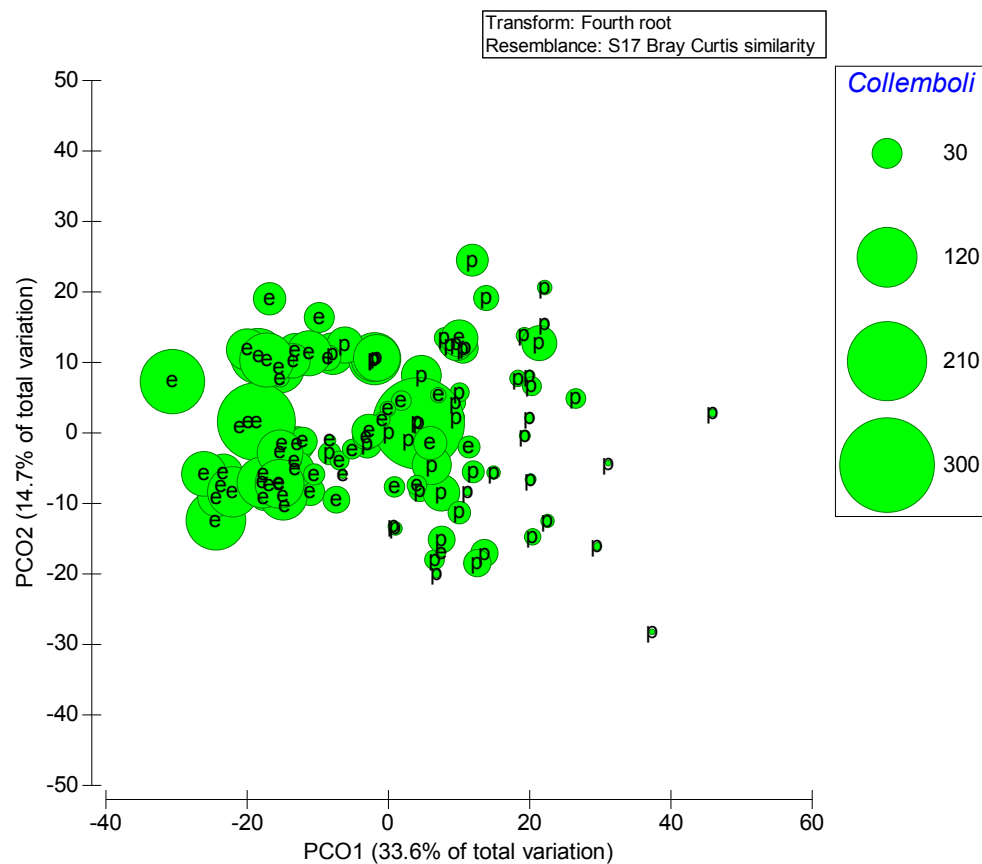
	<b>Primavera</b>	<b>Estate</b>				
Gruppi considerati	Abbondanze relative	Abbondanze relative	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
Acari	2,64	3,41	3,68	1,56	9,28	9,28
Pseudoscorpioni	0,17	1,12	3,52	1,57	8,86	18,13
Diplopodi	0,80	1,41	3,29	1,31	8,28	26,41
Imenotteri	0,69	0,97	3,16	1,19	7,96	34,37
Proturi	0,48	0,85	2,85	1,08	7,17	41,54
Araneidi	0,58	1,17	2,80	1,25	7,05	48,59
Coleotteri	0,85	1,47	2,74	1,19	6,91	55,50
Collemboli	1,98	2,40	2,66	1,36	6,70	62,20
Tisanotteri	0,54	0,89	2,50	1,18	6,30	68,50
Sinfili	0,20	0,66	2,38	0,98	6,00	74,50
Ditteri	1,28	1,31	2,16	1,06	5,43	79,93
Emitteri	0,06	0,62	2,15	0,81	5,41	85,34
Isopodi	0,14	0,55	2,03	0,90	5,12	90,46

In Fig. 3.33; 3.34; 3.35, 3.36 e 3.37 invece sono mostrati i grafici a bolle ottenuti sovrapponendo al diagramma della PCO in Fig. 3.31 le abbondanze dei taxa che contribuiscono maggiormente alle differenze tra le due stagioni. Come già evidenziato questi sono acari, collemboli, pseudoscorpioni, diplopodi ed imenotteri.



*Fig.3.33 Grafico a bolle dell'abbondanza degli acari, sovrapposto al diagramma PCO di tutti i campioni raccolti rappresentati in base al fattore stagione (p=primavera; e= estate) considerando le variabili biologiche esaminate. I numeri nel riquadro accanto al grafico in alto a destra stanno ad indicare le abbondanze.*





*Fig.3.34 Grafico a bolle dell'abbondanza dei collemboli, sovrapposto al diagramma PCO di tutti i campioni raccolti rappresentati in base al fattore stagione (p=primavera; e= estate) considerando le variabili biologiche esaminate. I numeri nel riquadro accanto al grafico in alto a destra stanno ad indicare le abbondanze.*

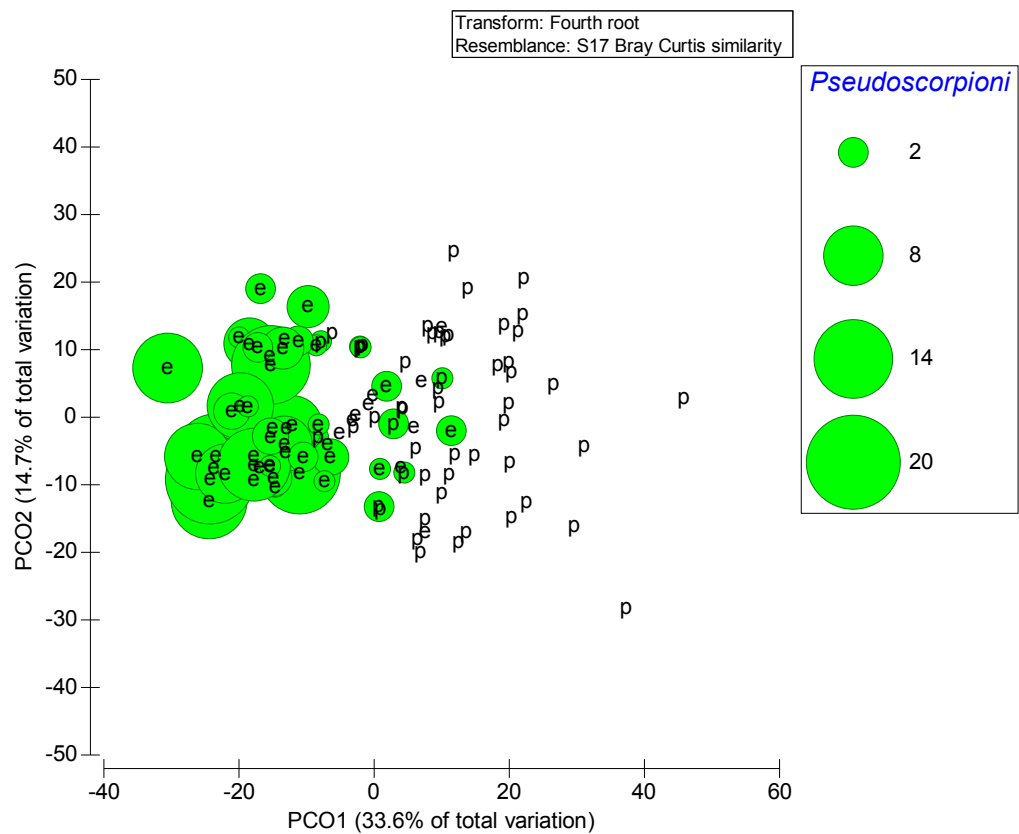


Fig.3.35 Grafico a bolle dell'abbondanza degli pseudoscorpioni, sovrapposto al diagramma PCO di tutti i campioni raccolti rappresentati in base al fattore stagione ( $p$ =primavera;  $e$ = estate) considerando le variabili biologiche esaminate. I numeri nel riquadro accanto al grafico in alto a destra stanno ad indicare le abbondanze.

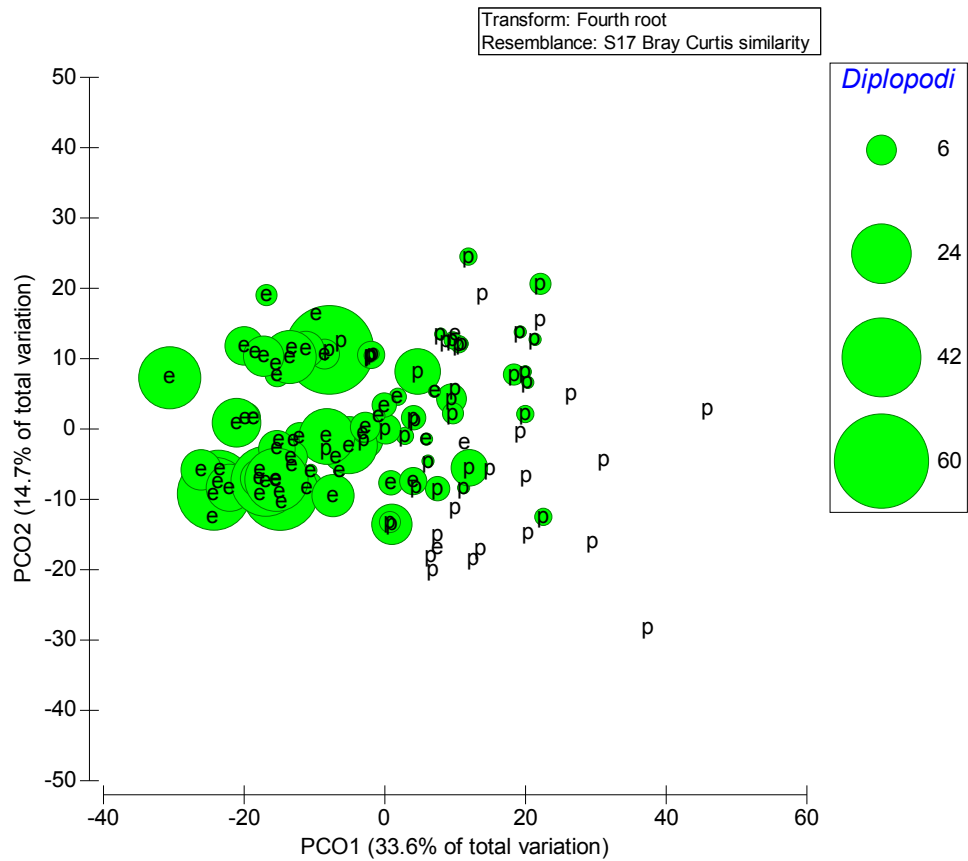
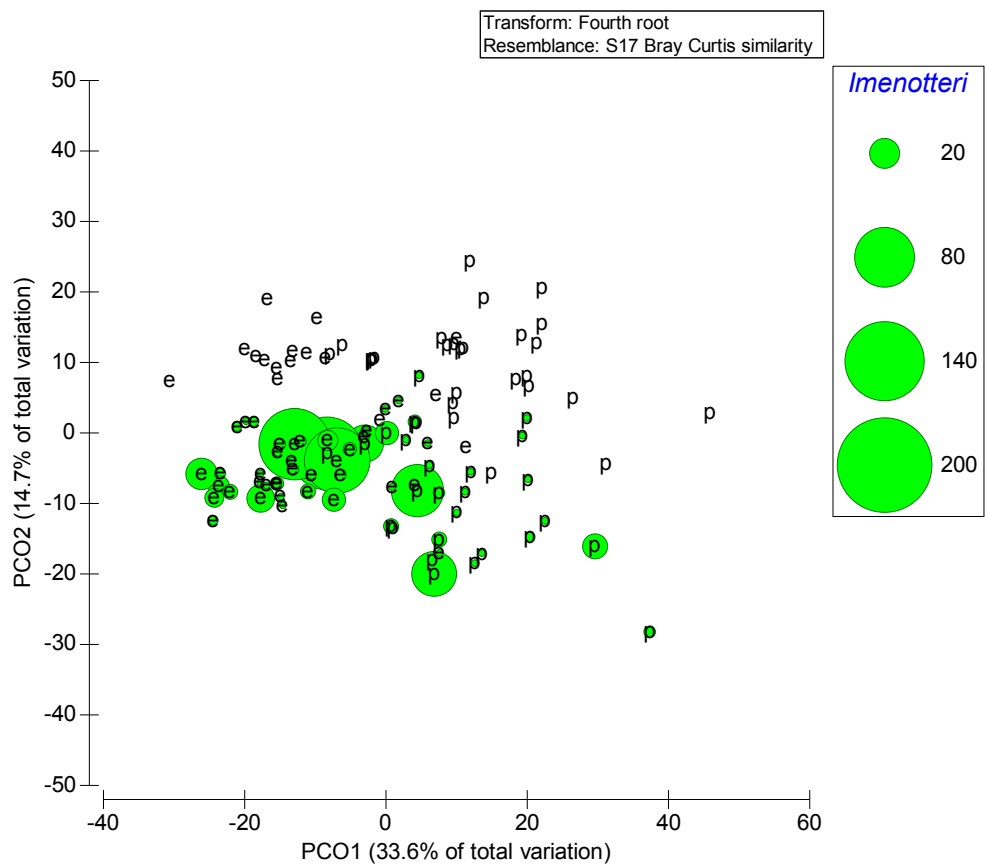


Fig.3.36 Grafico a bolle dell'abbondanza dei diplopodi, sovrapposto al diagramma PCO di tutti i campioni raccolti rappresentati in base al fattore stagione (p=primavera; e= estate) considerando le variabili biologiche esaminate. I numeri nel riquadro accanto al grafico in alto a destra stanno ad indicare le abbondanze.



*Fig.3.37 Grafico a bolle dell'abbondanza dei diplopodi, sovrapposto al diagramma PCO di tutti i campioni raccolti rappresentati in base al fattore stagione (p=primavera; e= estate) considerando le variabili biologiche esaminate. I numeri nel riquadro accanto al grafico in alto a destra stanno ad indicare le abbondanze.*

In Fig.3.38 invece sono mostrati i grafici a bolle ottenuti sovrapponendo al diagramma della PCO in Fig.3.33 l'abbondanza dei proturi rispetto ai pedotipi. E' interessante notare come i campioni che si trovano in alto nel diagramma della PCO, che sono per la maggior parte PIR, tendono ad avere densità elevate di proturi.

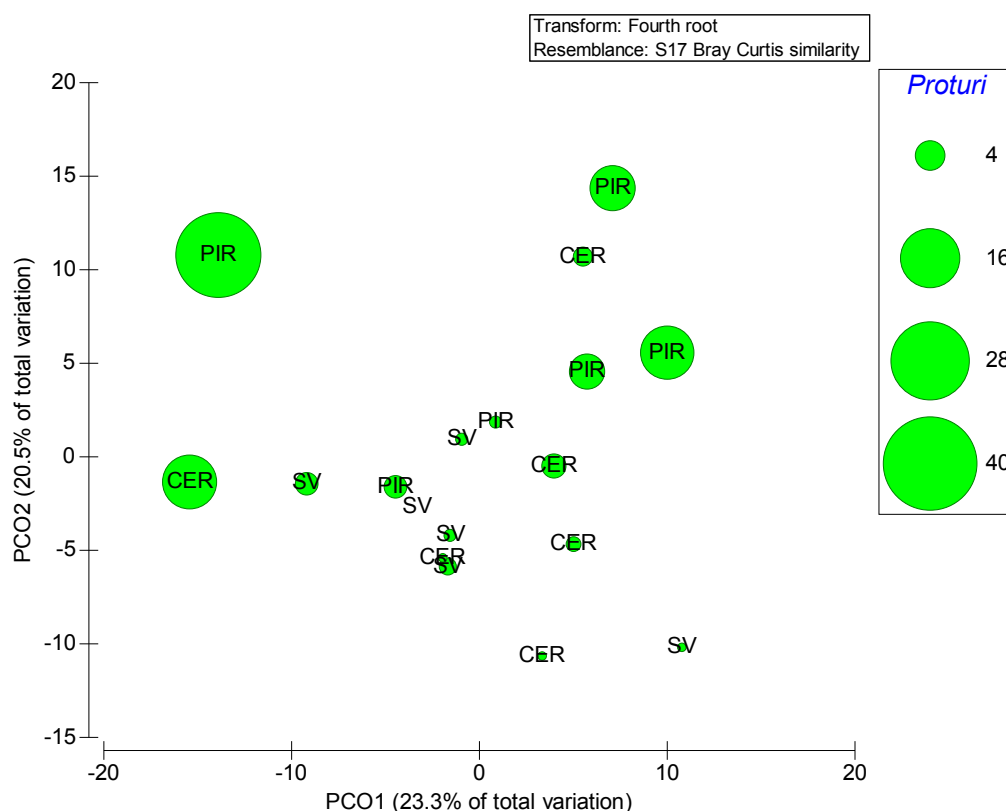


Fig.3.38 Grafico a bolle dell'abbondanza dei diplopodi, sovrapposto al diagramma PCO dei centroidi solo dei campioni estivi considerando le variabili biologiche esaminate. I numeri nel riquadro accanto al grafico in alto a destra stanno ad indicare le abbondanze.

### 3.4 Discussione

L'unico studio pubblicato sulle caratteristiche del popolamento dei microartropodi della Pineta San Vitale è quello di Scossioli (1974). Come già accennato nel paragrafo 3.1.3, il confronto tra i risultati di questo studio, basato su campionamenti effettuati alla fine degli anni '60 e quelli presentati in questo studio non è possibile in maniera significativa.

Per quanto riguarda le caratteristiche chimiche e fisiche del suolo si osserva che i campioni Pirottolo si presentano piuttosto distinti dagli altri. Infatti, per tale pedotipo si osserva un tenore medio di salinità sensibilmente maggiore che non negli altri due, così come maggiore risulta il contenuto d'acqua. Tali caratteristiche possono essere spiegate dal fatto che i suoli Pirottolo sono presenti nelle zone depresse con falda

superficiale da affiorante a semi-affiorante che, può presentarsi più o meno salmastra, come conseguenza legata al fenomeno dell'ingressione del cuneo salino. Inoltre, la stessa condizione di ristagno idrico per questo tipo di suoli può determinare un accumulo di sali nel suolo, come conseguenza del mancato allontanamento degli stessi dal sistema.

Allo stesso tempo, per i campioni di tale pedotipo, che presenta una tessitura che può essere di tipo sabbioso fine franca o franco sabbiosa fine, è stato determinato un contenuto maggiore della frazione argillosa, così come maggiori sono risultati il contenuto d'azoto (TKN) e il contenuto di carbonio organico (TOC).

A livello chimico-fisico le due zone Est ed Ovest risultano sostanzialmente equivalenti. L'unica indicazione di una qualche differenza si ha dall'analisi compiuta su tutti i campioni sulla base di pH, CE e contenuto in acqua. La differenza sembra in gran parte attribuibile alla presenza nella zona Ovest di alcuni campioni caratterizzati da un pH più basso anche se solo in due transetti 1 e 2 sia in primavera che in estate. I valori massimi di CE raggiunti nei campioni Ovest sono comparabili con quelli della zona Est, eccetto la stazione 4 PIR che presenta un valore più alto registrato, pari a 2,33 dS/m.

Obiettivo di questo studio era la valutazione degli effetti della salinizzazione sugli invertebrati del suolo. Proprio per cercare di valutare questi effetti è stato introdotto il fattore zona nel disegno di campionamento. Deve però essere sottolineato che di per sé evidenziare un effetto di questo fattore non significa dimostrare un effetto della salinizzazione. Dal momento che la falda e il suolo soggetto a salinizzazione sono solo nella zona Est, come evidenziato da Giambastiani (2006), non è infatti possibile disegnare un campionamento che separi la salinità da altre differenze che possono comunque esistere tra le due zone. Di fatto, come emerge da questo studio, ad una falda salinizzata durante il periodo estivo, non corrisponde un suolo salinizzato, eccetto, come appena accennato, la stazione 4PIR, zona Est, l'unico suolo che presenta una CE del suolo più elevata degli altri.

Per quello che riguarda la parte biologica, emerge dallo studio qui riportato, la Pineta è dominata da acari e collemboli con abbondanze maggiori rispetto a tutti gli altri. E' evidente una differenza di stagionalità per quello che riguarda le caratteristiche

dei popolamenti. In primavera i popolamenti presentano caratteristiche che non si riscontrano in estate.

Solamente in primavera si è evidenziata anche una differenza di caratteristiche nei microartropodi dovuta al fattore zona, cioè i popolamenti primaverili della zona Est non mostrano caratteristiche omogenee con quelle della zona Ovest.

I taxa che contribuiscono maggiormente a differenziare le due stagionalità sono gli acari, collemboli, pseudoscorpioni, diplopodi ed imenotteri. In particolare, poi, si evidenziano anche un maggiore numero in termini di abbondanze durante il periodo estivo. In merito a questo, analisi più dettagliate solo per il periodo primaverile e solo per il periodo estivo dei centroidi mostrano che comunque non esistono grandi differenze di composizione nei popolamenti delle diverse stazioni. Questo sembra almeno in parte dovuto al fatto che il popolamento è stato descritto sulla base dei taxa di rango elevato (*phyla*, classi, ordini), utilizzati nel calcolo dell'indice QBS-ar, che contengono al loro interno numerose specie. Ci si è chiesti inoltre se fosse possibile individuare un pattern di variazione generale lungo il gradiente che va dalle sommità dunali alle bassure interdunali. Dall'esame del diagramma PCO dei centroidi delle stazioni (Fig. 3.32), si evidenzia come le caratteristiche dei pedotipi cambino in merito alla stagionalità: i suoli PIR tendono a separarsi dai suoli CER ed SV. Da questa differenza è stato possibile constatare che vi è solo per quello che riguarda i proturi: vi è infatti un pattern di distribuzione particolarmente abbondante nei suoli di tipo Pirottolo durante il periodo estivo.

Probabilmente il risultato sarebbe stato diverso se si fosse descritto il popolamento sulla base delle singole specie o comunque utilizzando taxa di rango inferiore. Tuttavia, è importante anche osservare che l'area di studio è di dimensioni limitate e costituisce di fatto un continuum ambientale.

Considerando poi le classi di qualità del suolo, definite sulla base dei valori di QBS-ar max ottenuti, si osserva l'assenza di differenze sistematiche tra i pedotipi. Tutti presentano in media un valore 6, corrispondente ad una qualità biologica piuttosto elevata, anche in quelli che in primavera mostrano valori più bassi, in estate raggiungono la classe 6.

Tuttavia, va sottolineato che tali valori devono essere considerati solo delle indicazioni di massima, poiché il metodo per definirle è ancora in fase di messa a punto (Parisi, 2001).

Resta comunque il fatto che la Pineta risulta essere un ambiente semi-naturale, con una pressione antropica relativamente bassa, tale da permettere la definizione di una classe di qualità del suolo piuttosto elevata. Tale risultato è in linea con quelli di altri studi condotti in ambienti caratterizzati da un basso disturbo antropico, sebbene costituiti da biocenosi differenti, che hanno riportato classi di qualità comprese tra 5 e 7. Tale generale omogeneità può essere spiegata considerando le limitate dimensioni dell'area di studio e la sua uniformità ambientale.

Un ultimo aspetto d'indagine nel presente lavoro di tesi riguarda i possibili effetti di alcune delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo sulla composizione del popolamento di microartropodi.

L'applicazione del BIOENV utilizzando le variabili abiotiche misurate in corrispondenza dei punti di campionamento B in primavera, ha individuato come combinazione che massimizza la correlazione con la struttura del popolamento, quella costituita dalle variabili sabbia, argilla, contenuto in acqua, CE e pH. Tale correlazione risulta statisticamente significativa ( $P = 0.001$ ), anche se la relazione non è molto stretta, come si può evincere dal valore del coefficiente di correlazione ( $\rho = 0.196$ ). Il fatto che ci sia correlazione con queste variabili corrisponde al fatto che è stata osservata un'influenza del pedotipo. I suoli San Vitale presentano una tessitura più grossolana (contenuto di sabbia più elevato) e per questo il contenuto in acqua in questi suoli è minore e presentano una CE più bassa; mentre i suoli di tipo Pirottolo presentano una tessitura più fine (contenuto in argilla relativamente elevato), con un maggior contenuto in acqua ed una conduttività elettrica più elevata.



## **4. ESPERIMENTI DI LABORATORIO SUL LOMBRICO *Eisenia andrei***

### **4.1 Materiali e metodi**

#### **4.1.1 Allevamento di *Eisenia andrei***

I lombrichi adulti della specie *Eisenia andrei* utilizzati per avviare gli allevamenti sono stati forniti dalla Lombricoltura Compagnoni di Mandello del Lario (LC).

I vermi erano mantenuti in vasche di plastica della capacità di 10 L in cui si è disposto un substrato composto da 1 kg di torba di sfagno ed 1 kg di suolo argilloso, 1 kg di acqua distillata.

Per il presente studio (sia per gli allevamenti che per gli esperimenti) è stato utilizzato sempre lo stesso suolo naturale a tessitura argillosa, raccolto nel territorio del comune di Argenta. Una volta raccolto è stato essiccato a temperatura costante in camera termostatica a 30°C. Quando il suolo è risultato totalmente secco, i campioni sono stati triturati con macinatore per suolo a rulli e setacciati con setaccio ASTM a maglia da 2 mm di diametro per ottenere la cosiddetta “terra fine”.

In ciascuna vasca di allevamento Torba e suolo macinato sono stati mescolati in modo da ottenere un miscuglio uniforme e quindi inumiditi con 1 kg di acqua distillata. Il substrato così preparato aveva un pH di 6.26 e una conduttività elettrica (CE) a 25° di 1 dS/m. Queste caratteristiche chimico-fisiche sono state scelte soprattutto perché si è reso necessario tenere sotto controllo la CE dei terreni di allevamento poiché ciò che si voleva testare negli esperimenti era l’effetto della salinizzazione. Pertanto, una eccessiva CE nei terreni di coltura non sarebbe stata opportuna. Per questo motivo non si è ritenuto opportuno adottare la comune prassi di aggiungere letame al substrato di allevamento.

In ogni vasca erano sistemati 200-250 adulti. Gli allevamenti sono stati mantenuti in camere termostatiche alle stesse condizioni ambientali controllate poi utilizzate per gli esperimenti: temperatura costante di  $20 \pm 1$  °C, illuminazione di 400-800 lux, fotoperiodo di 16 h luce/8 h buio.

Ogni settimana si è provveduto alla cura degli allevamenti di lombrichi somministrando come alimento crusca o farina di avena inumidite con acqua distillata. Ogni 4-8 settimane tutti gli adulti presenti in una vasca erano separati dal substrato e trasferiti ad una vasca con nuovo substrato. A seconda delle esigenze il substrato, contenete i bozzoli deposti ed eventualmente i neonati era smaltito oppure mantenuto in allevamento in modo da permettere l'accrescimento dei giovani lombrichi allo scopo di sostituire gli individui adulti utilizzati negli esperimenti. Dal momento che il numero di neonati in ogni vasca era maggiore del numero di adulti che poteva essere poi mantenuto, quando la taglia dei giovani lombrichi permetteva di manipolarli, gli individui in eccesso erano eliminati. Si è così proceduto al mantenimento delle generazioni successive di *Eisenia andrei*.

#### **4.1.2 Procedura generale degli esperimenti**

In questo paragrafo è delineata la procedura generale adottata in tutti gli esperimenti, mentre nei paragrafi successivi saranno descritti gli aspetti specifici che differenziano tra loro i singoli esperimenti

Per l'esposizione dei lombrichi ai suoli sono stati utilizzati vaschette per alimenti in vetro Pyrex a base rettangolare di 20×12 cm e con altezza di 8 cm. In ogni vaschetta sono stati posti 600 g di suolo argilloso secco, trattato come già descritto al paragrafo 4.1.1 .

Il giorno antecedente l'inserimento dei lombrichi nei contenitori, il suolo è stato mescolato con soluzioni di cloruro di sodio a concentrazione nota e/o con quantità note di pesticida, e portato al grado di umidità giudicato ottimale (30%). Il giorno successivo, subito prima dell'inizio dell'esposizione dei lombrichi ai suoli così trattati è stato prelevato un campione di suolo umido del peso di 130 g, corrispondenti a 100 g in termini di peso secco da utilizzare per analisi chimiche. In questo modo

all'interno dei contenitori restava una quantità di suolo corrispondente a 600 g di suolo secco. Solamente durante il primo esperimento i lombrichi non sono stati alimentati, mentre, nei successivi, è stata somministrata settimanalmente farina di avena pari a 2 g inumidita con 10 ml di acqua distillata.

In ciascun contenitore sono stati posti 10 individui adulti di *E. andrei*. Su ciascuno di essi è stato poi fissato un foglio di materiale plastico su cui sono stati applicati numerosi fori per permettere la traspirazione. I contenitori sono stati quindi incubati in condizioni ambientali controllate per un periodo variabile tra 10 giorni e due mesi, in funzione degli effetti biologici che si intendevano misurare (temperatura: 20°C, illuminazione 400-800 lux; fotoperiodo 16 h luce/8 h buio).

Al termine del periodo di incubazione gli individui adulti sopravvissuti sono stati contati e ne è stato determinato il peso totale; gli individui sono stati poi suddivisi in piccoli gruppi, ciascuno trattato in modo appropriato alla determinazione di uno o più biomarker. Per quanto riguarda gli effetti sulla riproduzione, sono stati ricercati e conteggiati anche i bozzoli contenenti le uova e, eventualmente, gli individui neonati.

Per la ricerca delle uova ed i neonati, al termine dell'esperimento, il suolo di ciascun contenitore è stato riversato in una vaschetta di plastica e qui il terreno controllato sotto una lente di ingrandimento per tre volte successive. Il suolo, ove necessario, è stato frantumato delicatamente per rompere i piccoli grumi di terra e cibo formatisi usando una bacchetta di vetro arrotondata in punta onde evitare di poter danneggiare i neonati e le uova. Terminata questa fase di controllo, il terreno è stato ulteriormente controllato passandolo al setaccio di 2 mm per poter recuperare eventualmente dei piccoli o delle uova rimaste. Le uova ed i piccoli trovati sono stati poi conteggiati.

Le operazioni appena descritte sono state eseguite in conformità alle indicazioni di OECD (2004), tranne per il fatto che si è preferito utilizzare un suolo naturale, piuttosto che un substrato artificiale. Sono stati condotti 4 esperimenti distinti, utilizzando lo schema generale appena presentato. I primi tre esperimenti hanno valutato l'effetto di un singolo fattore di stress (salinità o chlorpyrifos) in assenza dell'altro; sono stati finalizzati soprattutto ad individuare l'intervallo di concentrazioni per l'ultimo esperimento, in cui si è valutato l'effetto combinato dei due fattori di stress. Inoltre, la concentrazione che determina il 50% di risposta ( $EC_{50}$ ) nei lombrichi

esposti alla sostanza fonte di stress è comparata a quella dei controlli in modo da poter determinare il NOEC e cioè la concentrazione in cui non si ha alcun effetto ed il LOEC cioè la concentrazione più bassa in cui si ha un effetto, sempre espresso in EC<sub>50</sub>. I dettagli operativi che caratterizzano i singoli esperimenti sono descritti nei paragrafi successivi.

#### **4.1.3 I biomarker utilizzati**

- Stabilità delle membrane lisosomiali: il fondamento della tecnica del Neutral Red Retention si basa sulla capacità dei lisosomi di assorbire e trattenere al loro interno il rosso neutro, un colorante cationico, che solo i lisosomi delle cellule sane sono in grado di bloccare stabilmente. I lisosomi delle cellule danneggiate tendono invece a rilasciare il Neutral Red nel citoplasma ad una velocità che è proporzionale al danno subito e che permette di quantificare l'entità dello stress. La procedura di analisi su *Eisenia andrei* si compone di due fasi: l'estrazione di celomociti dal tessuto fresco, la colorazione di questi mediante un colorante specifico chiamato neutral red e la lettura al microscopio dei vetrini contenenti le cellule colorate, che permette di quantificare il colorante trattenuto nei lisosomi al passare del tempo e valutare quindi l'entità del rilascio di colorante nel citosol. L'incubazione del colorante all'interno delle cellule è stata seguita per 60 minuti e ogni 15 minuti sono state scattate foto dei celomociti. Le fotografie sono poi state analizzate con il software Scion Image (versione Beta 4.0.2) per calcolare la densità ottica del colorante trattenuto all'interno dei lisosomi e valutare quindi la percentuale di rilascio.
- Accumulo di lipidi neutri insaturi all'interno dei lisosomi: questa viene effettuata attraverso un metodo citochimico su sezioni di lombrico dello spessore di 10 µm, ottenute al criostato, trasferite su vetrini da microscopia e colorate con Oil Red. Le sezioni di verme sono state poi fotografate al microscopio (ingrandimento 40x) e analizzate con il software Scion Image (versione Beta 4.0.2) per calcolare la densità ottica del colorante che si è legato

ai lipidi neutri all'interno dei lisosomi e valutare quindi il loro accumulo in pixel<sup>2</sup>.

- Accumulo di lipofuscine nei lisosomi: la quantificazione delle lipofuscine all'interno dei lisosomi viene effettuata attraverso un metodo citochimico su sezioni di verme dello spessore di 10 µm, ottenute al criostato, trasferite su vetrini da microscopia e colorate con una soluzione di cloruro di ferro 1% e ferrocianuro di potassio 1%. Le sezioni di verme sono poi state fotografate al microscopio (ingrandimento 40x) e analizzate con il software Scion Image (versione Beta 4.0.2) per calcolare la densità ottica del colorante che si è legato alle lipofuscine all'interno dei lisosomi e valutare quindi il loro accumulo in pixel<sup>2</sup>.
- Saggio dell'attività della catalasi: l'attività della catalasi è determinata misurando la diminuzione di assorbanza a 240 nm, dovuta al consumo di perossido di idrogeno da parte di questo enzima coinvolto nella detossificazione. Per poter effettuare l'analisi si prepara un omogenato di tessuto di lombrico e successivamente si aggiunge a questo il substrato di reazione. La reazione di diminuzione di assorbanza è seguita per due minuti e l'attività finale espressa come µmol/min per mg di proteine.
- Saggio dell'attività della glutatione S-trasferasi (GST): è determinata misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuta alla coniugazione dell'1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) con il glutatione ridotto (GSH). Per poter effettuare l'analisi si prepara un omogenato di tessuto di lombrico e successivamente si aggiunge a questo il substrato di reazione. La reazione è seguita per 10 minuti e l'attività finale espressa in nmol/min per mg di proteine.

#### **4.1.4 Conduttività elettrica e pH dei suoli**

Subito prima dell'inizio dell'esposizione, da ciascun contenitore si è prelevato un campione di suolo per l'analisi del pH e della conduttività elettrica, una delle

misure più utilizzate per quantificare la salinità dei suoli. La conduttività elettrica è stata misurata sull'estratto suolo:acqua 1:2,5 (CE 1:2,5) in base ai metodi riportati nel par. 3.2.6 del MiPAF (2000). Dai dati ottenuti sono stati poi estrapolati i valori di conduttività elettrica in pasta satura (CE ps), utilizzando l'equazione di regressione lineare suggerita da Somnetz et al. (2008) per i suoli a tessitura argillosa.

#### **4.1.5 Primo esperimento: effetti della sola salinizzazione**

Questo esperimento ha valutato l'effetto della salinizzazione del suolo, in assenza di pesticidi e ha seguito lo schema generale riportato al paragrafo 4.1.2, con le seguenti caratteristiche specifiche:

- durata dell'esposizione: 10 giorni;
- trattamenti: 6 livelli di salinizzazione ottenuti aggiungendo al suolo essiccato soluzioni di cloruro di sodio disciolto in acqua distillata alle seguenti concentrazioni: 0 (trattamento di controllo); 0,44; 1,33; 4; 12; 36 g/L (la soluzione a concentrazione più elevata corrisponde alla salinità dell'acqua di mare);
- le soluzioni di cloruro di sodio sono state aggiunte nella quantità richiesta a portare il suolo secco ad una umidità del 30%;
- repliche: 2 vaschette per ciascun trattamento;
- endpoint valutati: mortalità, accrescimento ed i seguenti biomarker: glutazione S-trasferasi, saggio dell'attività della catalasi, valutazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi, accumulo di lipofuscine e di lipidi neutri nei lisosomi, stabilità delle membrane lisosomiali. In questo esperimento non è stata valutata la riproduzione ma solo il numero ed il peso degli adulti al termine dell'esperimento.

#### **4.1.6 Secondo esperimento: effetti della sola salinizzazione**

Anche in questo esperimento si è valutato l'effetto della salinizzazione del suolo, in assenza di pesticidi. I livelli di salinità utilizzati sono stati scelti sulla base

dell'esperimento precedente. La maggior durata dell'esposizione ha permesso anche una valutazione degli effetti sulla riproduzione. È stato adottato lo schema generale del paragrafo 4.1.2, con le seguenti caratteristiche specifiche:

- durata dell'esposizione: 28 giorni;
- trattamenti: 6 livelli di salinizzazione ottenuti aggiungendo al suolo essiccato soluzioni di cloruro di sodio in acqua distillata alle seguenti concentrazioni: 0 (trattamento di controllo); 0,1; 0,33; 1,1; 3,63; 12 g/L.
- le soluzioni di cloruro di sodio sono state aggiunte nella quantità richiesta a portare il suolo secco ad una umidità del 30%;
- repliche: 2 vaschette per ciascun trattamento;
- endpoint valutati: mortalità, accrescimento, riproduzione (numero di bozzoli deposti).

#### **4.1.7 Terzo esperimento: effetti del solo chlorpyrifos**

È stato valutato l'effetto del chlorpyrifos, in un suolo non salinizzato. Il chlorpyrifos è stato somministrato come Cyren 7.5 G, un formulato granulare per la lotta agli insetti che vivono nel terreno e sulla sua superficie (geodisinfestante) il cui unico ingrediente attivo è il chlorpyrifos (7.5% in peso).

È stato adottato lo schema generale del paragrafo 4.1.2, con le seguenti caratteristiche specifiche:

- durata dell'esposizione: 28 giorni;
- trattamenti: 6 livelli di chlorpyrifos, ottenuti aggiungendo al suolo essiccato i granuli di Cyren 7.5, nelle seguenti quantità: 0 (trattamento di controllo); 42,2; 133; 422; 1333; 4216 mg/kg. Le corrispondenti concentrazioni di chlorpyrifos su suolo secco sono: 0; 3,16; 10; 31,6; 100; 316 mg/kg;
- una volta miscelato a secco l'insetticida con il suolo è stata aggiunta acqua distillata, in modo da raggiungere il 30% di umidità;
- repliche: 2 vaschette per ciascun trattamento;

- endpoint valutati: mortalità, accrescimento, riproduzione (numero di bozzoli deposti) e inibizione dell'acetilcolinesterasi.

#### **4.1.8 Quarto esperimento: effetti combinati di salinizzazione e chlorpyrifos**

In questo esperimento è stato valutato l'effetto congiunto di salinizzazione e chlorpyrifos. È stato adottato lo schema generale del paragrafo 4.1.2, con le seguenti caratteristiche specifiche:

- durata dell'esposizione: 28 giorni per gli adulti. Al termine del periodo di incubazione gli individui adulti sopravvissuti sono stati contati e ne è stato determinato il peso totale; gli individui sono stati poi suddivisi in piccoli gruppi, ciascuno trattato in modo appropriato alla determinazione di uno o più biomarker. Il suolo poi è stato rimesso di nuovo nella rispettiva vaschetta e continuato l'incubazione per altri 28 giorni. Questo ha permesso ai bozzoli deposti di schiudere i piccoli.
- durata dell'esposizione: 28 giorni per i bozzoli deposti e i neonati; durante questa fase i suoli con le uova vengono alimentati a 3 g di farina di avena più 6 g di acqua distillata.
- giorno 56 di esposizione: conteggio delle uova e dei neonati come riportato nel par. 4.1.2.
- 5 concentrazioni di chlorpyrifos: 0; 5; 10; 40; 80 mg/kg (principio attivo su suolo secco), ottenute aggiungendo i granuli di Cyren 7.5 G al suolo secco
- 4 livelli di salinità: 0, 2,5; 5; 10 g/L, ottenuti aggiungendo le soluzioni di cloruro di sodio al suolo secco già miscelato con il Cyren 7.5 G, nella quantità richiesta a portare il suolo ad una umidità del 30%;
- I livelli di chlorpyrifos e salinità sono stati combinati come indicato in Tab. **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** , ottenendo 17 trattamenti distinti;



- repliche: 2 vaschette per ciascun trattamento, 4 per il trattamento di controllo (0 salinità, 0 chlorpyrifos);
- endpoint valutati: mortalità, accrescimento, riproduzione (numero di bozzoli deposti e numero di neonati vivi alla fine dei 56 giorni di esposizione) e inibizione dell'acetilcolinesterasi.

*Tab. 4.1. Codici identificativi dei trattamenti utilizzati nel quarto esperimento. Le combinazioni a cui corrisponde un codice, rappresentano trattamenti effettivamente allestiti.*

NaCl (g/L)	Chlorpyrifos (mg/kg)					
	0	5	10	20	40	80
0	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
2.5	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	
5	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	
10	3.0					

#### 4.1.9 Conduttività elettrica e pH dei suoli

Prima dell'inizio di ogni esperimento è stato prelevato rispettivamente per ogni campione 50 g di suolo che è stato essiccato in incubatore in vaschette di alluminio ad una temperatura costante di 30 °C. Quando il terreno è risultato totalmente secco, i campioni sono stati pestati con un mortaio e successivamente setacciati con setaccio ASTM a maglia da 2 mm di diametro per ottenere la cosiddetta “terra fine”. Su 25 g di terra fine si sono poi eseguite le analisi per la valutazione della CE e del pH. La CE è stata misurata sull'estratto suolo:acqua 1:2,5 (CE 1:2,5) in base ai metodi riportati nel par. 3.2.6 del MiPAF (2000). Dai dati ottenuti sono stati poi estrapolati i valori di conduttività elettrica in pasta satura (CE ps), utilizzando l'equazione di regressione lineare suggerita da Somnetz et al. (2008) per i suoli a tessitura argillosa.

#### **4.1.10 Analisi dei dati**

Per verificare l'esistenza di effetti statisticamente significativi del cloruro di sodio alle concentrazioni saggate, i risultati riguardanti i parametri del ciclo vitale (accrescimento, riproduzione e sopravvivenza) e i biomarker sono stati valutati con il test dell'analisi della varianza (ANOVA, ANalysis Of VAriance). Questo metodo statistico è basato sulla scomposizione della variabilità totale osservata in due componenti: quella dovuta a differenze tra trattamenti (in questo caso tra diverse concentrazioni di NaCl) e quella residua, alle differenze entro i trattamenti. Quando l'ANOVA risultava significativa ( $p < 0,05$ ) è stato usato il test di Dunnet, che individua quali sono i trattamenti significativamente diversi dal controllo. Questo test ha permesso di determinare il NOEC (No Observed Effect Concentration), la più alta concentrazione per la quale non si è verificato un effetto avverso statisticamente significativo rispetto al controllo e il LOEC (Lowest Observed Effect Concentration), la più bassa concentrazione per il quale si è osservato un effetto avverso statisticamente significativo rispetto al controllo.

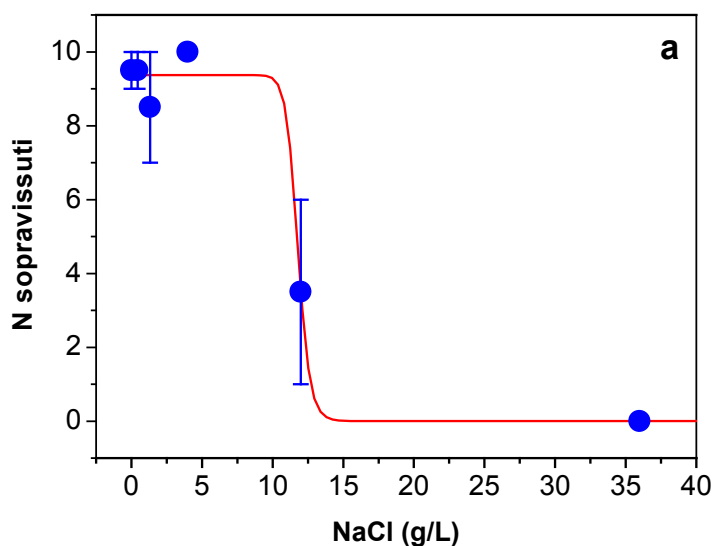
Tutte le analisi statistiche sono state condotte usando il software StatSoft Statistica versione 6.0.

## 4.2 Risultati

### 4.2.1 Primo esperimento: effetti della sola salinizzazione

Per quanto riguarda i parametri del ciclo vitale, si è osservato un effetto significativo della salinità sia sulla sopravvivenza che sull'accrescimento (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**). In particolare, nessun individuo tra quelli esposti alla salinità più elevata (36 g/L) è sopravvissuto.

I dati permettono una grossolana stima dell'  $EC_{50}$ , cioè della concentrazione di NaCl nella soluzione di spiking che provoca un effetto del 50%. Questo valore è pari a 12 g/L per la sopravvivenza (numero di individui vivi al termine dei 10 giorni di esposizione), corrispondente a 3,6 g/kg in termini di concentrazione su suolo secco e a 12 dS/m in termini di conduttività della pasta satura. L' $EC_{50}$  per l'accrescimento (peso vivo degli individui sopravvissuti) è pari a 8 g/L, corrispondente a 2,5 g/kg in termini di concentrazione su suolo secco e a circa 9 dS/m in termini di conduttività della pasta satura.



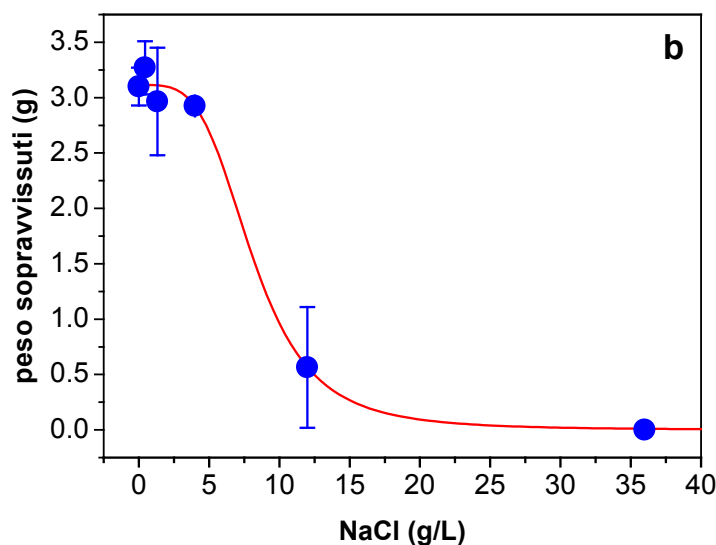


Fig. 4.1. Primo esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Relazione tra salinità e: a) numero di individui sopravvissuti dopo 10 giorni di esposizione; b) peso finale dei vermi sopravvissuti. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard.

Per quanto riguarda i biomarker la salinità ha un effetto significativo sulla stabilità delle membrane lisosomiali, misurata con il saggio del rosso neutro e sull'attività dell'enzima catalasi (Fig. 4.2). Le caratteristiche delle relazioni concentrazione-risposta non hanno permesso di stimare l' $EC_{50}$ . In particolare la catalasi mostra, come ci si attende per questo biomarker una risposta non monotona in funzione della concentrazione. Risulta però evidente che questi biomarker rispondono già alla concentrazione più bassa (0,44 g/L di NaCl nella soluzione di spiking, corrispondente a 0,2 g/kg nel suolo e una conduttività della pasta satura di 4 dS/m).

Per quanto riguarda gli altri biomarker analizzati, non è stato possibile evidenziare un effetto significativo della salinità. Un tale comportamento, del resto, era atteso almeno per quanto riguarda l'attività dell'acetilcolinesterasi, che risponde in modo specifico alla presenza di pesticidi organofosforici e carbamati, assenti nel presente esperimento.

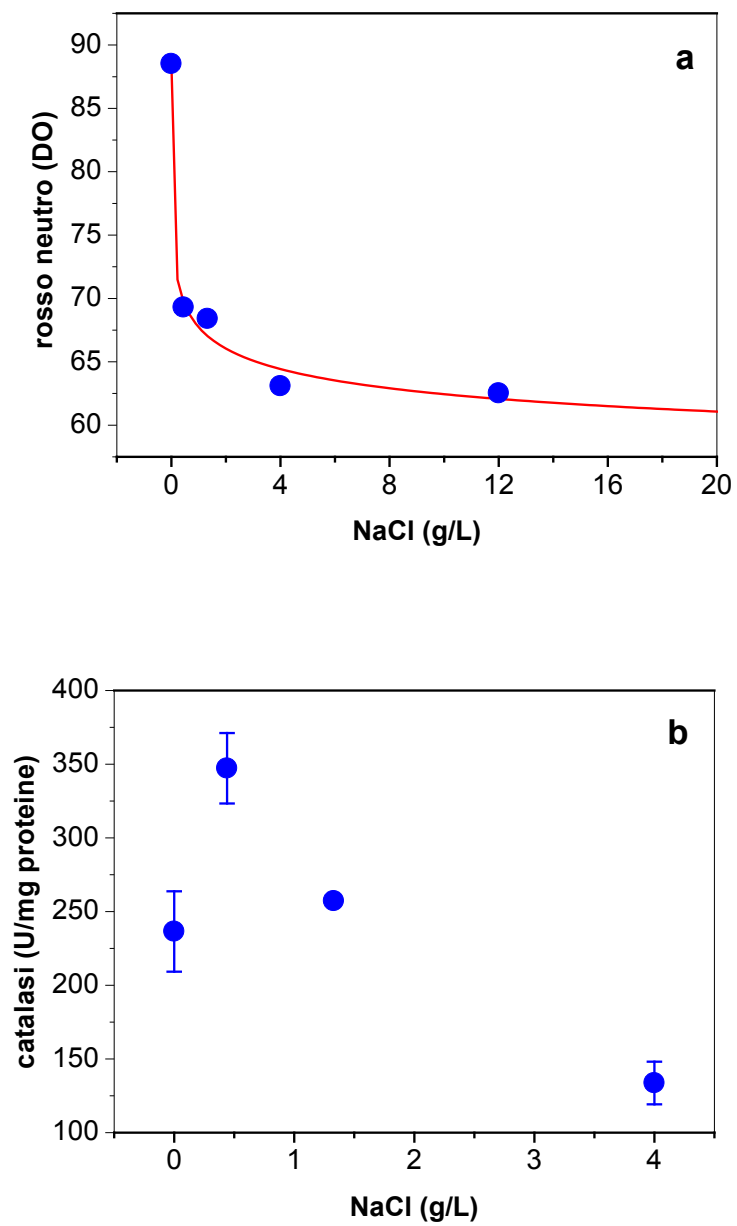
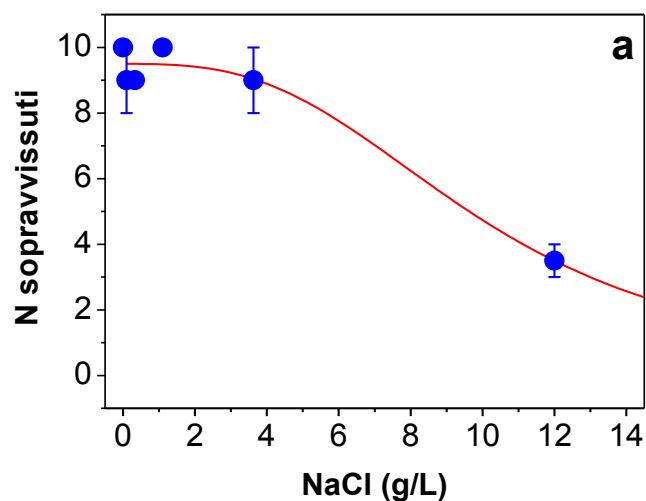


Fig. 4.2. Primo esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Relazione tra salinità e: a) stabilità delle membrane lisosomiali misurata come densità ottica del colorante rosso neutro; b) attività dell'enzima catalasi. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard.

#### 4.2.2 Secondo esperimento: effetti della sola salinizzazione

Al termine dei 28 giorni di esposizione è stato osservato un effetto significativo della salinità su tutti i parametri del ciclo vitale (Fig. 4.3). In particolare, in corrispondenza della salinità più elevata (12 g/L), si è osservata una drastica riduzione di sopravvivenza e accrescimento e una totale assenza di riproduzione, coerentemente con quanto osservato nel primo esperimento. Le  $EC_{50}$  per la riproduzione (numero di bozzoli deposti durante i 28 giorni di esposizione) è pari a 4,6 g/L, corrispondente a 1,4 g/kg come NaCl su suolo secco e a una conduttività della pasta satura di 5,6 dS/m.

Contrariamente a quanto verificatosi per i parametri del ciclo vitale, non è stato possibile evidenziare un effetto significativo della salinità per nessuno dei biomarker analizzati.



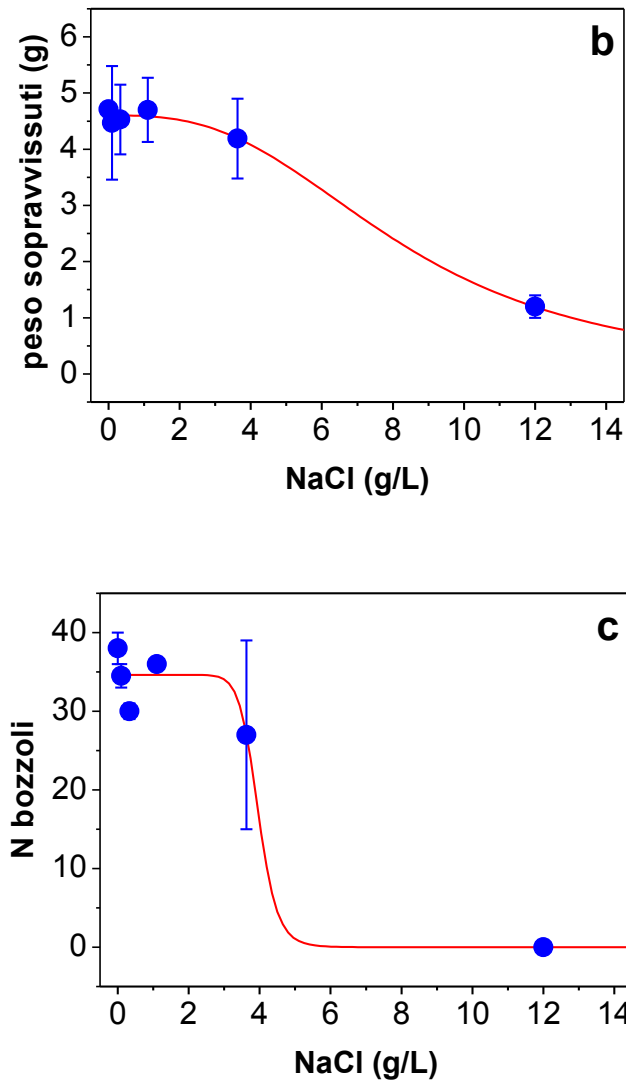


Fig. 4.3. Secondo esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Relazione tra salinità e: a) numero di individui sopravvissuti dopo 28 giorni di esposizione; b) peso finale dei vermi sopravvissuti; c) numero di bozzoli deposti durante i 28 giorni di esposizione. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard.

### **4.2.3 Terzo esperimento: effetti del solo chlorpyrifos**

Al termine dei 28 giorni di esposizione è stato osservato un effetto significativo della concentrazione di chlorpyrifos su tutti i parametri del ciclo vitale. Nessun individuo è sopravvissuto tra quelli esposti alla concentrazione più elevata (316 mg/kg in termini di principio attivo su suolo secco). Per quanto riguarda le altre concentrazioni (comprese tra 3,16 e 100 mg/kg), sopravvivenza e accrescimento non risultano significativamente diverse dal controllo. Al contrario, la riproduzione (numero di bozzoli deposti) è già sensibilmente ridotta a 100 mg/kg (4.4a). L'EC<sub>50</sub> per la riproduzione è pari a 85 mg/kg.



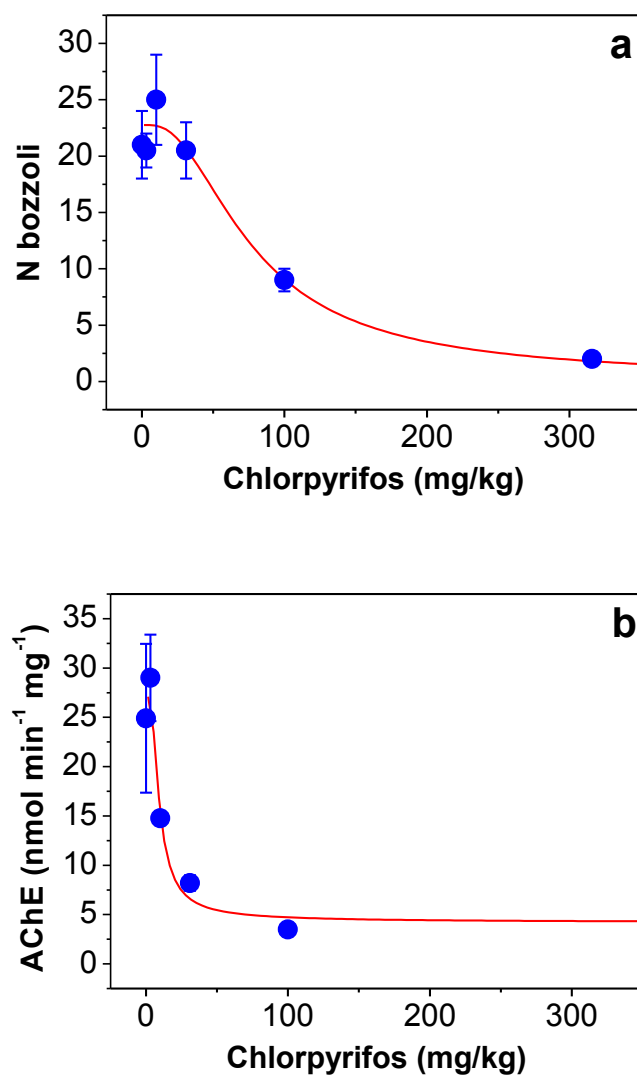


Fig. 4.4. Terzo esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Relazione tra concentrazione dell'insetticida organofosforico chlorpyrifos nel suolo e: a) numero di bozzoli deposti durante i 28 giorni di esposizione; b) attività dell'enzima acetilcolinesterasi al termine dell'esposizione. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard.

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (4.4b), unico biomarker saggiato in questo esperimento, diminuisce in modo evidente e statisticamente significativo all'aumentare della concentrazione di chlorpyrifos. L' $EC_{50}$  risulta essere 10 mg/kg. Come atteso, dal momento che si tratta di un target molecolare specifico degli

insetticidi organo fosforici, questo biomarker risulta molto più sensibile al chlorpyrifos rispetto a tutti i parametri del ciclo vitale.

I risultati di questi tre primi esperimenti hanno permesso di quantificare, per quanto in modo piuttosto approssimativo l'effetto atteso su riproduzione e attività dell' AChE in corrispondenza di diversi livelli di salinità e concentrazione di chlorpyrifos, nel caso in cui questi due agenti di stress agiscano singolarmente, cioè ciascuno in assenza dell'altro.

Queste informazioni, in particolare le stime di  $EC_{50}$ , sono state utilizzate per identificare i trattamenti da utilizzare nel quarto esperimento. In particolare, tenendo conto delle limitazioni logistiche, si è cercato di individuare un insieme di concentrazioni di chlorpyrifos in grado di rappresentare adeguatamente tutto il possibile spettro di risposte: da una effetto piuttosto contenuto dell'attività dell'AChE, ad una drastica riduzione della riproduzione; la concentrazione di chlorpyrifos più bassa saggiata nel quarto esperimento corrisponde infatti approssimativamente alla metà dell' $EC_{50}$  per l'AChE, mentre la più elevata con l' $EC_{50}$  per il numero di bozzoli deposti.

Per individuare i livelli di salinizzazione ci si è invece basati unicamente sulla risposta riproduttiva, dal momento che la salinità da sola non ha provocato effetti sull'AChE. Sempre con l'intenzione di descrivere adeguatamente uno spettro di risposte possibili si sono considerati livelli di salinità compresi tra metà e il doppio dell' $EC_{50}$  per il numero di bozzoli deposti. La combinazione delle concentrazioni di chlorpyrifos e dei livelli di salinità così individuati ha determinato i trattamenti effettivamente saggiati nel terzo esperimento.

#### **4.2.4 Quarto esperimento: effetti combinati di salinizzazione e chlorpyrifos**

Al termine dei primi 28 giorni di esposizione la sopravvivenza degli adulti è stata del 100% in tutti i trattamenti. Quindi né la salinità né l'insetticida hanno causato mortalità in *E. andrei*, nemmeno ai livelli più alti saggiati. Questo risultato era in

buona parte atteso in quanto l'esperimento era stato progettato soprattutto per valutare effetti cronici e subletali.

Per quanto riguarda l'accrescimento, valutato in termini di peso totale dei lombrichi in ciascuna replica sperimentale (Fig. 4.5), si evidenzia una riduzione significativa rispetto al controllo solo alla più alta salinità saggiata (NaCl 10 mg/L) e alla più elevata concentrazione di chlorpyrifos (80 mg/kg).

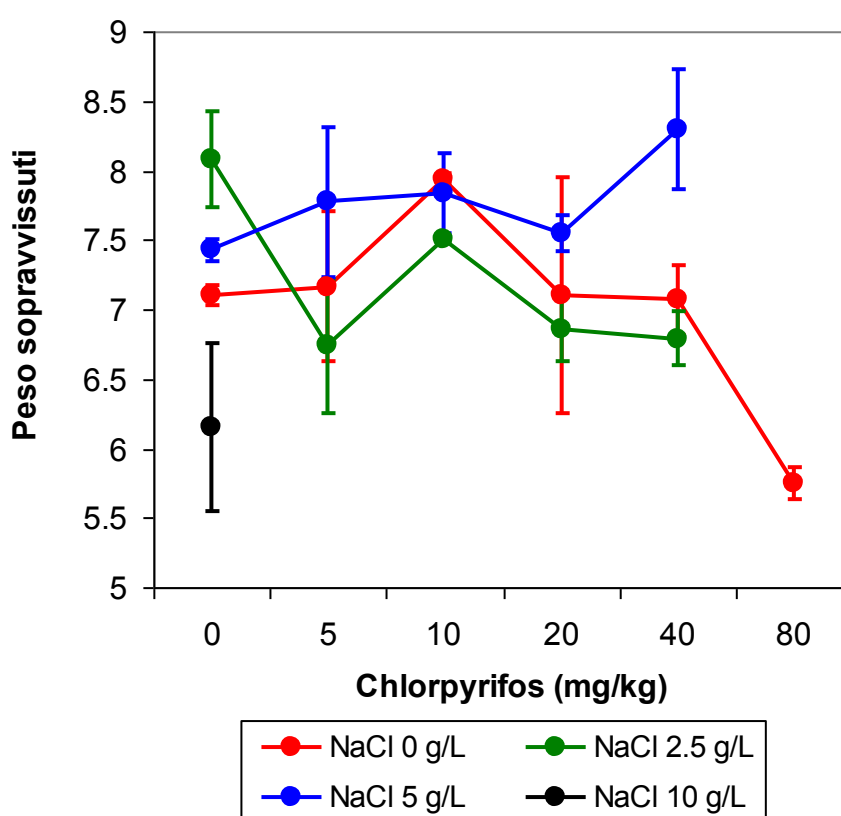


Fig. 4.4. Quarto esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sul peso degli individui adulti sopravvissuti a 28 giorni di esposizione. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard.

Per i trattamenti che rientrano nel disegno ortogonale a due fattori, non si evidenziano differenze significative come è possibile osservare in Tab. 4.2. Si osserva però un sensibile abbassamento del peso rispetto al controllo nel trattamento 3.0 (NaCl 10 g/L) e nel trattamento 0.5 (chlorpyrifos 80 mg/kg).

*Tab. 4.2 Tavola di ANOVA per l'effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sul peso degli individui adulti sopravvissuti a 28 giorni. (I trattamenti 3.0 e 0.5 non sono stati considerati perché non rientrano nel disegno ortogonale a due fattori). NaCl=Salinità, Ch= chlorpyrifos*

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
NaCl	1.68	2	0.84	2.54	0.112
Ch	0.6	4	0.15	0.45	0.768
NaClxCh	2.49	8	0.31	0.94	0.511
Residua	4.95	15	0.33		
Totale	9.72	29			

Per quanto riguarda la riproduzione, il chlorpyrifos riduce il numero di bozzoli depositi (Fig. 4.6) solo alla più elevata concentrazione saggiata, 80 mg/kg. In corrispondenza di questo livello di insetticida il numero di bozzoli è ridotto circa al 50% di quello del controllo, in accordo con i risultati del terzo esperimento in cui era stato stimata una  $EC_{50}$  pari a 85 mg/kg. La salinità non ha effetto significativo a 2,5 g/L. Invece a 5 g/L il numero di bozzoli è ridotto circa del 50% e a 10 g/L la riproduzione è azzerata, in buon accordo con i risultati del secondo esperimento.

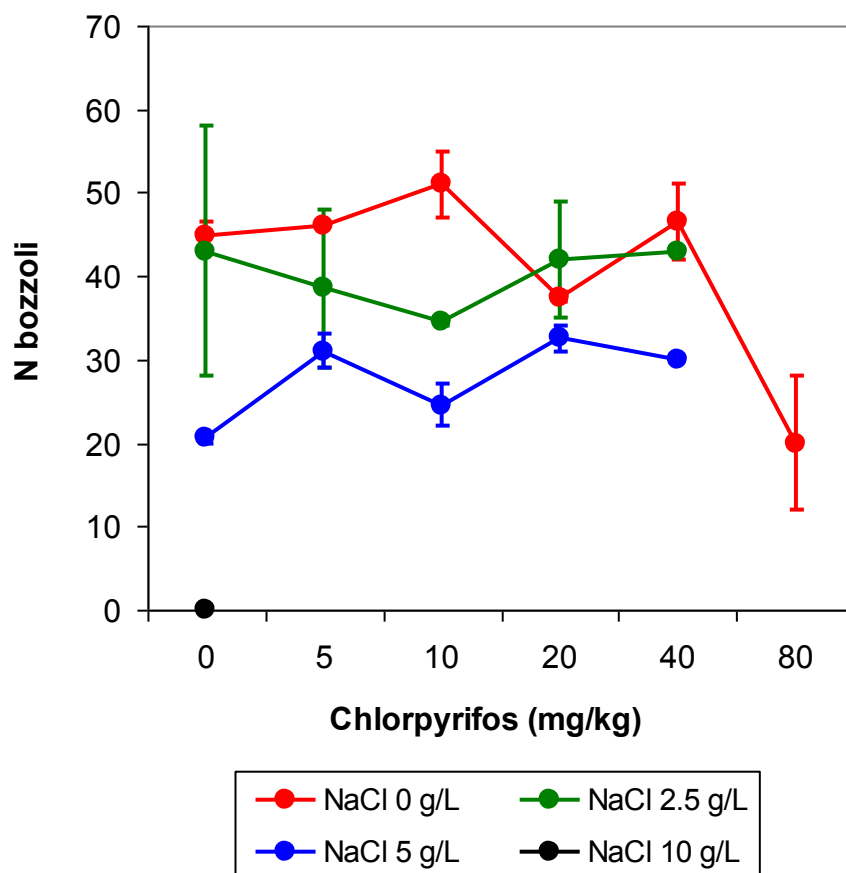


Fig. 4.6. Quarto esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sul numero di bozzoli deposti durante 28 giorni di esposizione. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard.

Per quanto riguarda i trattamenti che rientrano nel disegno ortogonale a due fattori, si osserva un effetto significativo della salinità ma non del chlorpyrifos (Tab 4.3). Si osserva però un sensibile abbassamento rispetto al controllo nel trattamento 0.5 (chlorpyrifos 80 mg/kg).

Tab. 4.3 Tavola di ANOVA per l'effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sul numero dei bozzoli deposti durante 28 giorni di esposizione. (I trattamenti 3.0 e 0.5 non sono stati considerati perché non rientrano nel disegno ortogonale a due fattori). In rosso il fattore salinità significativo. NaCl=Salinità, Ch= chlorpyrifos.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
NaCl	1618	2	809	14.61	0.0003
Ch	54	4	14	0.24	0.9089
NaClxCh	448	8	56	1.01	0.4675
Residua	831	15	55		
Totale	2950	29			

E' quindi possibile stabilire l'EC<sub>50</sub> per entrambi i fattori di stress considerati separatamente:

EC<sub>50</sub> per NaCl (in assenza di chlorpyrifos): 4.9 g/L.

EC<sub>50</sub> per chlorpyrifos (in assenza di NaCl): 79 mg/kg.

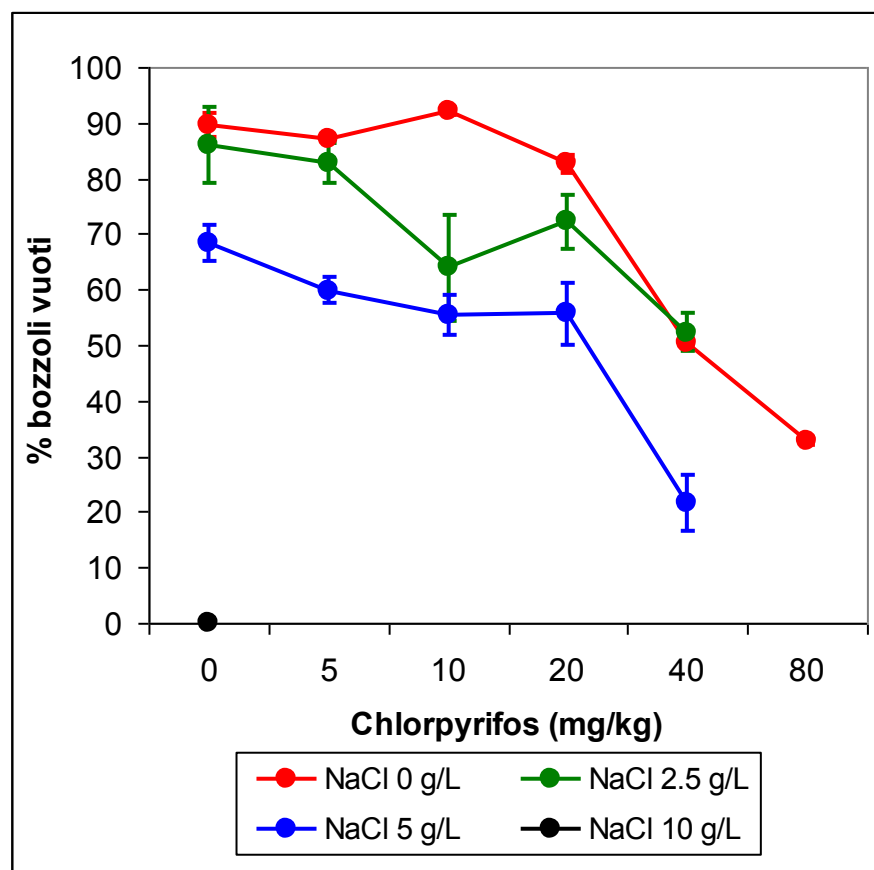


Fig. 4.7 Quarto esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Effetto congiunto della salinità e dell'insetticida Clorpirifos sulla percentuale (%) di bozzoli schiusi (vuoti), rispetto al numero totale di bozzoli deposti durante 28 giorni di esposizione. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard.

In questo esperimento, oltre al numero di bozzoli deposti, è stato possibile misurare due ulteriori indicatori dell'attività riproduttiva: la percentuale di bozzoli schiusi rispetto al totale dei deposti e il numero di neonati vivi al termine dei 56 giorni complessivi di esposizione.

Per quello che riguarda la percentuale di bozzoli schiusi, anche considerando solo i trattamenti che rientrano nel disegno ortogonale, si osserva un effetto significativo sia della salinità che del clorpirifos. Non risulta però significativa l'interazione il che suggerisce che la salinità non modifica la risposta al chlorpyrifos (Fig. 4.7 e Tab. 4.4).

Tab. 4.4. Tavola di ANOVA per l'effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sulla percentuale (%) di bozzoli schiusi, rispetto al numero totale di bozzoli deposti durante 28 giorni di esposizione. (I trattamenti 3.0 e 0.5 non sono stati considerati perché non rientrano nel disegno ortogonale a due fattori). In rosso i fattori significativi.  
NaCl=Salinità, Ch= chlorpyrifos.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
NaCl	4155	2	2078	56.53	0
Ch	5775	4	1444	39.29	0
NaxCh	620	8	77	2.11	0.101
Residua	551	15	37		
Totale	11102	29			

Il numero di neonati ha mostrato, rispetto al numero dei bozzoli, un comportamento più complesso (Fig. 4.8). La salinità, in assenza di insetticida, ha un effetto molto evidente: già a 5 g/L il numero di neonati è ridotto dell'80%. Considerando l'effetto dell'insetticida in assenza di aggiunta di NaCl, alla concentrazione 10 mg/kg di chlorpyrifos, si osserva un aumento significativo del numero di neonati rispetto al controllo. Tale numero diminuisce poi fino ad azzerarsi alle concentrazioni più elevate. Questo fenomeno, detto ormesi, non appare se si considerano le curve concentrazione-risposta del chlorpyrifos nei suoli a cui è stato aggiunto NaCl.



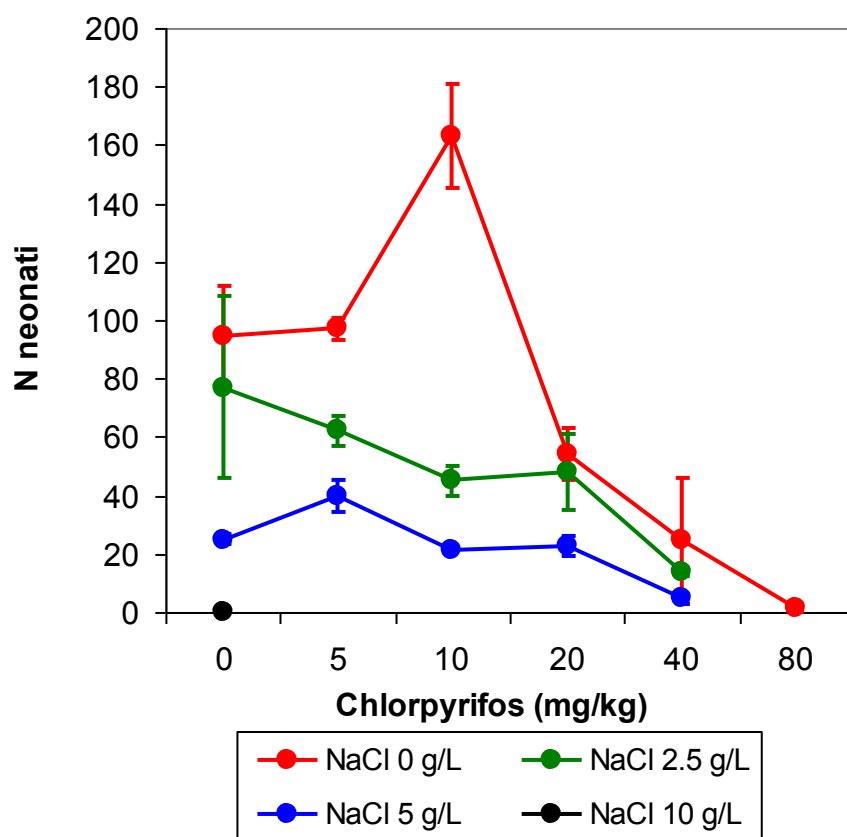


Fig. 4.8 Quarto esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sul numero di neonati vivi al termine dei 56 giorni di esposizione. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard.

Tab. 4.5 Tavola di ANOVA per l'effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sul numero dei neonati al termine dei 56 giorni di esposizione con NaCl e chlorpyrifos. (I trattamenti 3.0 e 0.5 non sono stati considerati perché non rientrano nel disegno ortogonale a due fattori). In rosso i fattori e le interazioni significative. NaCl=Salinità, Ch= chlorpyrifos

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
NaCl	20708	2	10354	26.92	0
Ch	15071	4	3768	9.8	0.0004
NaClxCh	12478	8	1560	4.06	0.0095
Residua	5769	15	385		
totale	54026	29			

SNK: a 0 NaCl la differenza tra 0 e 10 Chlorpyrifos è significativa (ormesi)

D'altra parte, se si considerano i tre trattamenti identificati dai codici 0.4, 2.0 e 1.3 (vedi Tab. 4.1), non si mette in evidenza sinergismo. Infatti l'effetto sia del trattamento 0.4 (40 mg/kg di chlorpyrifos in assenza di NaCl), sia del trattamento 2.0 (5 mg/L di NaCl, in assenza di chlorpyrifos) è una riduzione dell'80% nella produzione di neonati rispetto al trattamento di controllo (0.0). Questi due trattamenti rappresentano quindi l'EC<sub>80</sub> rispettivamente per chlorpyrifos e NaCl. Il trattamento 1.3 (NaCl 2.5 g/L + chlorpyrifos 20 mg/kg) rappresenta quindi una miscela ½ EC<sub>80</sub> NaCl + ½ EC<sub>80</sub> chlorpyrifos. In presenza di sinergismo l'effetto del trattamento 1.3 dovrebbe essere maggiore dell'effetto sia di 0.4 che di 2.0.

L'effetto di interazione dei due fattori di stress, quindi, non rientra completamente in nessuno dei modelli canonici (additività, sinergismo o antagonismo) e sembra dipendente dalle specifiche concentrazioni o dallo specifico rapporto tra le concentrazioni delle due sostanze. La situazione è resa particolarmente complessa dalla presenza dell'ormesi.

L'attività dell'acetilcolinesterasi è significativamente ridotta all'aumentare della concentrazione di chlorpyrifos (Fig. 4.5). Come si può vedere in Tab. 4.6 risulta

significativo l'effetto del chlorpyrifos. Risulta invece non significativo l'effetto della salinità. Quindi non solo la salinità non ha, da sola effetto sull'AChE, ma non influenza nemmeno la risposta dell'enzima all'insetticida.

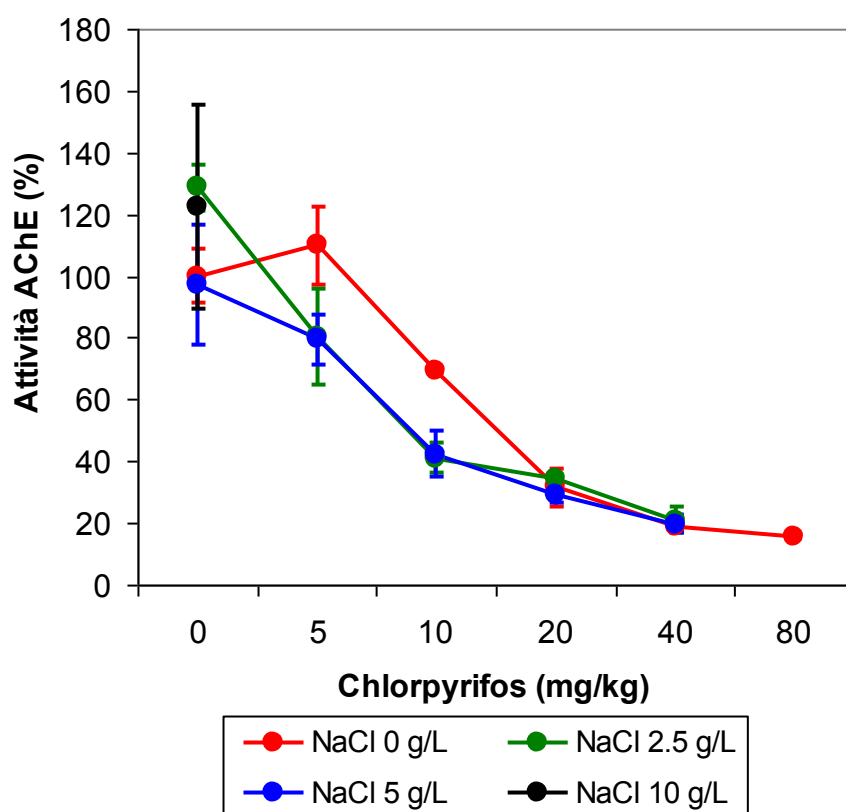


Fig. 4.5. Quarto esperimento sul lombrico *Eisenia andrei*. Effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sull'attività dell'enzima acetilcolinesterasi espressa come percentuale dell'attività media dei controlli, dopo 28 giorni di esposizione. Medie di due repliche  $\pm$  errore standard. L'attività è espressa come percentuale del valore medio del trattamento di controllo.

Tab. 4.6 Tavola di ANOVA per l'effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos sull'acetilcolinesterasi. I trattamenti 3.0 e 0.5 non sono stati considerati perché non rientrano nel disegno ortogonale a due fattori). In rosso i fattori e le interazioni significative.  
NaCl=Salinità, Ch= chlorpyrifos

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
NaCl	388.26	2	194.13	2.33	0.131
Ch	17071.80	4	4267.95	51.32	0
NaClxCh	1335.99	8	167.00	2.01	0.1164
Residua	1247.45	15	83.16		
Totale	20043.50	29			

#### 4.2.5 Conduttività elettrica e pH dei suoli

Come si può osservare dalla Tab. 4.7 il pH dei suoli del primo esperimento risulta essere neutro, leggermente alcalino con valori compresi intorno a 7. All'aumentare della salinità il pH rimane invariato come si può osservare dai codici di trattamento. Per quello che riguarda la CE, questa aumenta, ovviamente, in funzione dell'aumento della salinità. Nell'ultima colonna della tabella, i valori di conduttività espressi in pasta satura mostrano già una conduttività piuttosto elevata nelle concentrazioni di controllo. In seguito, pur prelevando il suolo dallo stesso sito, si è verificato che il lotto di suolo utilizzato per gli esperimenti avesse una conduttività ben al di sotto del limite di 4 dS/m, conduttività considerata come limite per un suolo salinizzato.

*Tab 4.7. CE e pH dei suoli del primo esperimento: effetto della sola salinità*

<b>Codice trattamento</b>	<b>NaCl g/L</b>	<b>pH</b>	<b>CE 1:2,5 25°C (dS/m)</b>	<b>CE ps 25°C (dS/m)</b>
<b>0A</b>	0	7.54	0.86	3.40
<b>0B</b>	0	7.56	0.81	3.18
<b>1A</b>	0.44	7.55	0.90	3.54
<b>1B</b>	0.44	7.55	0.91	3.57
<b>2A</b>	1.33	7.53	1.16	4.47
<b>2B</b>	1.33	7.52	1.23	4.75
<b>3A</b>	4	7.48	1.85	7.02
<b>3B</b>	4	7.5	1.78	6.79
<b>4A</b>	12	7.5	3.26	12.22
<b>4B</b>	12	7.5	3.50	13.10
<b>5A</b>	36	7.58	7.78	28.85
<b>5B</b>	36	7.57	8.48	31.43

In Tab.4.8 sono presentati invece i valori di pH dei suoli del secondo esperimento. Anche in questo caso si presenta neutro, leggermente alcalino con valori compresi intorno a 7. All'aumentare della salinità il pH rimane invariato come si può osservare dai codici di trattamento. Per quello che riguarda la CE, nell'ultima colonna della tabella, i valori di conduttività espressi in pasta satura mostrano un *range* di variazione che va da 1.99 dS/m per il controllo fino ad un massimo di 11.9 dS/m.

*Tab 4.8. CE e pH dei suoli del secondo esperimento: effetto della sola salinità*

<b>Codice trattamento</b>	<b>NaCl g/L</b>	<b>pH</b>	<b>CE 1:2,5 25°C (dS/m)</b>	<b>CE ps 25°C (dS/m)</b>
<b>0A</b>	0	6.75	0.48	1.99
<b>0B</b>	0	7.57	0.50	2.07
<b>1A</b>	0.1	7.51	0.52	2.15
<b>1B</b>	0.1	7.59	0.52	2.13
<b>2A</b>	0.33	7.53	0.57	2.31
<b>2B</b>	0.33	7.68	0.53	2.17
<b>3A</b>	1	6.63	0.67	2.70
<b>3B</b>	1	7.61	0.70	2.80
<b>4A</b>	3.63	7.64	1.12	4.33
<b>4B</b>	3.63	7.76	1.17	4.52
<b>5A</b>	12	7.59	2.98	11.19
<b>5B</b>	12	7.6	2.93	11.00

Nella Tab. 4.9 vengono riportate invece i risultati del quarto ed ultimo esperimento. Il pH dei suoli risulta essere neutro, leggermente alcalino con valori compresi intorno a 7. Quindi sia in presenza di sola salinità che in presenza di solo pesticida o in presenza di entrambi il pH rimane invariato come si può osservare dai codici di trattamento. Per quello che riguarda la CE, questa aumenta, ovviamente, in funzione dell'aumento della salinità, ma non viene influenzata dalla presenza o meno del pesticida.

A livello applicativo, i valori ottenuti sperimentalmente in laboratorio possono essere confrontati con i valori sotto riportati in Tab. 4.10. In questa tabella sono

riportati valori crescenti di salinità del suolo espressi in pasta satura (CE ps) a cui sono associate colture più o meno tolleranti.

Emerge che, già a livelli molto bassi di salinità, colture come le cipolle, i pomodori, i fagioli e le mandorle presentano estrema sensibilità a suoli che presentano tale CE. Risultano più tolleranti invece il cotone, le olive, la segale, l'orzo.

*Tab 4.9. CE e pH dei suoli del quarto esperimento: effetto congiunto della salinità e dell'insetticida chlorpyrifos.*

<b>Codice trattamento</b>	<b>NaCl g/L</b>	<b>Chlorp mg/Kg</b>	<b>pH</b>	<b>CE 1:2,5 25°C (dS/m)</b>	<b>CE ps 25°C (dS/m)</b>
<b>0.0A</b>	0	0	7.66	0.53	2.17
<b>0.0B</b>	0	0	7.79	0.52	2.14
<b>0.4A</b>	0	40	7.78	0.51	2.09
<b>0.4B</b>	0	40	7.79	0.51	2.11
<b>1.0A</b>	2.5	0	7.73	1.11	4.30
<b>1.0B</b>	2.5	0	7.75	1.12	4.35
<b>1.4A</b>	2.5	40	7.79	1.15	4.44
<b>1.4B</b>	2.5	40	7.77	1.16	4.48
<b>2.0A</b>	5	0	7.75	1.75	6.64
<b>2.0B</b>	5	0	7.73	1.75	6.66
<b>2.4A</b>	5	40	7.71	1.76	6.69
<b>2.4B</b>	5	40	7.71	1.74	6.61
<b>3.0A</b>	10	0	7.58	3.10	11.61
<b>3.0B</b>	10	0	7.6	2.98	11.20

Tab 4.10 Tolleranza di alcune colture in condizioni di suolo salino. La salinità è espressa in conduttività elettrica in pasta satura (CE ps).

Tolerance of some crops to saline conditions. Salinity expressed as electrical conductivity.					
Sensitive (0-4 dS m <sup>-1</sup> )	Moderately Tolerant (4-6 dS m <sup>-1</sup> )	Tolerant (6-8 dS m <sup>-1</sup> )	Highly Tolerant (8-12 dS m <sup>-1</sup> )		
Almond	Corn	Fig	Barley		
Bean	Grain Sorghum	Oats	Cotton		
Clover	Lettuce	Pomegranate	Olive		
Onion	Soybean	Sunflower	Rye		
Potato	Tomato	Wheat	Wheatgrass		
Adapted from Brady, N.C., 2002, The Nature and Properties of Soils, New Jersey, USA, Prentice Hall.					

### 4.3 Discussione

Gli effetti della salinizzazione a livello agricolo sono soprattutto dovuti ad una salinizzazione di tipo secondario e cioè dovuti principalmente all'uso di acqua salina utilizzata per l'irrigazione. Questo è un argomento di crescente interesse a causa dell'aumento del fabbisogno di acqua per l'irrigazione e la concorrenza per questa risorsa sia a livello industriale che agricolo.

Nell'area del Mediterraneo la Tunisia è un esempio, in cui le risorse di acqua dolce per uso agricolo sono piuttosto limitate e dove in agricoltura è principalmente utilizzata acqua salina per l'irrigazione. Per questo motivo una ricerca sul campo è stata effettuata già nel 1960, nel progetto quadro dell' UNESCO (UNESCO, 1970) Katerji N. et al. (2000). Spesso, al problema della salinità, si aggiunge quello dell'uso di pesticidi. In un rapporto della FAO (FAO, 2001), i terreni agricoli costituiscono il 50% di tutto il territorio utilizzabile a livello mondiale e si afferma che l'uso di pesticidi è aumentato dell' 854% dal 1961 al 1999. Nonostante la salinizzazione del suolo riguardi vaste aree aride e semi-aride del pianeta, questo è un problema poco studiato. Sono anche poco studiati gli effetti congiunti del suolo salinizzato in presenza di pesticidi.



Anche se molti studi di tossicità sono stati condotti ciò non toglie che solo pochi pesticidi in uso sono stati sperimentati per valutare gli effetti sul lombrico e relativamente poche le specie testate sia in prove di laboratorio che in campo (Lebrun et al., 1981; Cathay, 1982; Karnak e Hamelink, 1982; Iofs-Holmin, 1982; Kalaiselvan et al., 1996; Chang et al., 1997; Vishwanathan, 1997; Reinecke Sophie e Reinecke, 1997; Helling et al., 2000) (Venkateswara Rao J. et al., 2003).

In base ai risultati ottenuti dagli esperimenti effettuati in laboratorio sull'effetto della salinizzazione del suolo su *E. andrei*, si ha che i suoli con una conduttività elettrica compresa tra 5 e 6 dS/m, anche in assenza di altri agenti di stress, riducono in modo drastico la riproduzione dei lombrichi. Suoli con questa conduttività sono classificati come salini, ma in grado di consentire la coltivazione di colture moderatamente tolleranti alla salinità. (Tab 4.10). Ad una conduttività di circa 11 dS/m si ha una completa inibizione della riproduzione ed un evidente effetto anche sulla sopravvivenza e l'accrescimento. Si tratta di suoli fortemente salini, ma ancora in grado di consentire la coltivazione delle specie altamente tolleranti alla salinità (orzo, segale, olive). In base quindi ai dati di laboratorio ottenuti e da altri studi recenti (Reinecke & Reinecke, 2007) si evidenziano i potenziali problemi di conservazione della biodiversità nelle zone agricole in cui i pesticidi vengono ampiamente utilizzati. Infatti, suoli anche moderatamente salini creano disturbo alla fauna terricola, evento che a lungo termine è negativo per la fauna stessa e ai fini della produttività agricola.

Per molti decenni, il solo monitoraggio chimico degli inquinanti è stato la procedura usuale per valutare lo "stato di salute" degli ecosistemi. Valutare la presenza esclusiva di uno o più contaminanti specifici ha sempre però avuto i suoi limiti. Per esempio, le caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente può influire sulla distribuzione delle sostanze chimiche, i composti che si degradano velocemente non possono essere rilevati, e le analisi chimiche spesso possono essere complicate e costose da effettuare.

Tuttavia, la maggiore preoccupazione per quanto riguarda il monitoraggio chimico è che esso non affronta la biodisponibilità e l'assorbimento delle sostanze stesse, né la inter-specifica differenza di vulnerabilità alla tossicità in un organismo, né affronta il problema dell'impatto di miscele complesse di contaminanti (Moore et al. 2004). Quindi, è chiaro che vi è grande divario tra la misurazione della presenza di

contaminanti chimici e l'alterazione dei parametri ecologici quali i cambiamenti nella composizione della comunità. L'uso quindi di endpoint biologici (biomarker) è stato proposto come un importante strumento per valutare la salute generale dei singoli organismi che popolano gli ecosistemi contaminati. I biomarkers sono generalmente definiti come misure funzionali di esposizione da effetti dovuti a fattori di stress che possono insorgere a livello molecolare, cellulare, a livello fisiologico o comportamentale di un organismo (McCarthy e Munkittrick, 1996).

Tenendo conto di quanto appena detto è stato sviluppato il Weight of Evidence (WOE) (Chapman et al., 2002), un approccio multidisciplinare che combina diverse linee di evidenza: analisi chimiche tradizionali integrate, studi di laboratorio e sul campo per misurare la biodisponibilità degli inquinanti e valutazione degli effetti a diversi livelli dell'organizzazione biologica, dal molecolare fino a livello di comunità (Chapman, 2007; Chapman et al, 2002; Chapman e Hollert, 2006; Dagnino et al, 2008).

Si è reso necessario pertanto in questo lavoro effettuare oltre ai tradizionali test ecotossicologici basati sugli endpoint del ciclo vitale, anche una serie di biomarkers, in particolare la valutazione dell'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi perché già dimostrato essere sensibile ai pesticidi organofosforici ((Rao et al, 2003; Aamodt et al., 2007; Collange et al., 2010).

Si è reso necessario pertanto in questo lavoro effettuare oltre ai test ecotossicologici anche una serie di biomarkers, in particolare la valutazione dell'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi perché già dimostrato essere sensibile ai pesticidi organofosforici ((Rao et al, 2003; Aamodt et al., 2007; Collange et al., 2010).

I biomarker utilizzati in questo studio sono risultati meno sensibili alla salinità rispetto ai parametri del ciclo vitale, in particolare la riproduzione; questo accade anche in relazione alle caratteristiche “naturali” dei suoli, come tessitura e contenuto in materia organica. D'altra parte i biomarker sono stati messi a punto e usati proprio con l'obiettivo di rispondere alla contaminazione e non ai fattori naturali. Questo è rilevante ai fini del biomonitoraggio, in quanto evita fattori di confusione dovuti alle fluttuazioni di parametri naturali.

dell'acetilcolinesterasi al chlorpyrifos risulta circa quattro volte maggiore, in termini di  $EC_{50}$ , rispetto alla riproduzione, misurata in termini di produzione di bozzoli. Si è quindi verificata una notevole riduzione dell'attività di questo enzima ad una concentrazione di 10 mg/kg di insetticida. A questa stessa concentrazione si evidenzia un fenomeno di ormesi per quanto riguarda il numero di neonati. Questa concentrazione decisamente elevata rispetto a quelle generalmente misurate sul campo. Corrisponde comunque alla concentrazione raggiunta nel suolo applicando 40 kg/ha, la massima dose consigliata del formulato utilizzato (Cyren 7.5 G). Tale dose quindi non risulterebbe del tutto priva di effetti biologici sugli organismi non target, anche in assenza di altri agenti di stress.

La combinazione degli indici utilizzati (parametri del ciclo vitale e biomarker) permette da un lato una diagnosi precoce della presenza di contaminanti nel suolo, dall'altro la valutazione degli effetti di stress dovuti a parametri che possiamo definire naturali, seppur generati dall'intervento dell'uomo come l'aumento della salinità.

## 5. CONCLUSIONI

Per quanto riguarda lo studio di campo si conferma che le caratteristiche chimiche e fisiche dei suoli della Pineta S. Vitale variano secondo un modello comune lungo il gradiente compreso tra le sommità dunali e le bassure interdunali. In particolare, i suoli classificati come Pirottolo sulla base della loro posizione, sono sempre ben distinguibili rispetto ai suoli identificati come Cerba e San Vitale. Questi due pedotipi appaiono meno chiaramente distinti tra loro.

Non è invece possibile individuare un pattern valido per tutti i transetti campionati per quanto riguarda la struttura del popolamento di microartropodi, né è possibile definire un popolamento tipico per ciascun pedotipo. Anche per quanto riguarda i risultati dell'applicazione metodo QBS-ar, i tre pedotipi risultano sostanzialmente equivalenti. Tuttavia, soprattutto in estate, i popolamenti dei suoli Pirottolo tendono ad essere relativamente simili tra loro e differenziati rispetto ai popolamenti degli altri pedotipi.

Nel periodo estivo la salinizzazione sembra interessare una buona parte della falda della zone Est della Pineta, ma solo nella stazione 4PIR si è determinata una marcata salinizzazione del suolo in superficie. Non è quindi stato possibile evidenziare un effetto della salinizzazione sulla pedofauna.

La correlazione tra caratteristiche chimiche e fisiche del suolo e struttura del popolamento, pur risultando statisticamente significativa, è abbastanza debole e quindi gran parte delle differenze osservate tra i popolamenti delle diverse stazioni non possono essere spiegate sulla base delle variabili abiotiche misurate. Le variabili abiotiche più strettamente associate alle caratteristiche del popolamento sono quelle che differenziano tra loro i tre pedotipi.

In estate si assiste ad un aumento generalizzato dell'abbondanza dei taxa di microartropodi rispetto alla primavera, in particolare acari, collemboli, pseudoscorpioni, diplopodi e imenotteri. In estate tende aumentare anche la qualità biologica del suolo, valutata attraverso il metodo QBS-ar; nel complesso i valori

dell'indice sono comunque elevati. Infatti, in un intervallo di valori che va da 0 (pessimo) a 7 (ottimo) in primavera nella maggior parte dei suoli si raggiunge il valore 6, ad eccezione del 2PIR, l'unico caso in cui si registra il valore più basso pari a 3. In estate, invece, i suoli raggiungono tutti classe 6 con l'ottimo in 2CER e 3CER.

I risultati ottenuti nello studio sperimentale di laboratorio indicano che si possono manifestare effetti avversi sui parametri del ciclo vitale dei lombrichi, in particolare sulla riproduzione anche a livelli di salinizzazione che ancora consentono molte coltivazioni.

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi non risulta influenzata dalla salinità; d'altra parte si è evidenziata una marcata inibizione di questo enzima a concentrazioni di chlorpyrifos che sono elevate rispetto a quelle generalmente misurate in campo, ma sono ancora compatibili con l'uso consigliato. A questi stessi livelli di concentrazione è stata osservata un effetto di ormesi sulla riproduzione, misurata in termini di numero di neonati prodotti.

Per quanto riguarda l'effetto combinato di questi due fattori di stress, la salinità sembra modificare la relazione esposizione-risposta al chlorpyrifos per quanto riguarda la riproduzione. La salinità invece, oltre a non avere alcun effetto sull'AChE in assenza di insetticida, non influenza la risposta dell'enzima al chlorpyrifos quando questo è presente.

## BIBLIOGRAFIA

Aamodt et al. (2007). Recovery of cholinesterase activity in *Eisenia fetida* savigny following exposure to Chlorpyrifos. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 26, No. 9, pp. 1963–1967.

Anderson M.J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecology.

Anderson M.J. Gorley R.N., Clarke K.R. (2008). PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK.

Antonellini M., Mollema P., Giambastiani B., Bishop K., Caruso L., Minchio A., Pellegrini L., Sabia M., Ulazzi E., Gabbianelli G. (2008). Salt water intrusion in the coastal aquifer of the southern Po Plain, Italy. Hydrogeology Journal 16: 1541–1556.

APAT (2002). Guida tecnica sui metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati. Utilizzo di indicatori ecotossicologici e biologici.

APAT (2002). Proposed plan against beach erosion and environmental restoration of the Emilia-Romagna coast.

Arfelli D. (1975). Quando c'era la pineta. Edizioni del Girasole. Ravenna.

ARPA Piemonte AA.VV. (2002). Tecniche di biomonitoraggio della qualità del suolo.

Aspetti G. P., Boccelli R., Ampollini D., Del Re A. A. M., Capri E. (2010). Assessment of soil-quality index based on microarthropods in corn cultivation in Northern Italy. Ecological Indicators 10: 129–135.

Autorità dei Bacini Regionali Romagnoli (2003). Il territorio dell'Autorità dei Bacini Regionali Romagnoli, Regione Emilia-Romagna. Consultabile su:  
<http://www.regione.emilia-romagna.it/baciniromagnoli/studio1.htm>

Bacchi S; Buscaroli A.; Paladin L.; Zannoni D.; Pasteris A. (2011). Indagine sui microartropodi e sulla qualità biologica dei suoli della Pineta di San Vitale (Ravenna, Italia): primi risultati. Atti del Convegno Nazionale della Società Italiana della Scienza del Suolo, EQA – Qualità ambientale 7: 7-16.

Bassi A. (2002). Guida alla flora della pineta di San Vitale, vol. I, Longo Editore Ravenna.

Bassi A. (2004). Guida alla flora della pineta di San Vitale, vol. II, Longo Editore Ravenna.

Benan T. et al. (2006). Characteristics of soil fauna community in the Dongjiao coconut plantation ecosystem in Hainan, China. *Acta Ecologica Sinica* 26(1): 26–32.

Benassai E., Ragone A., Cavazza S., Buffoni E., Dal Cin R., Calderoni G., Simeoni U., Biagini E. (1979). *Le spiagge di Romagna: uno spazio da proteggere*, Quaderno n. 2, Lo Scarabeo, Bologna.

Bockl M. et al. (1998). Colonisation of a copper-decontaminated soil by micro- and mesofauna. *Applied Soil Ecology* 9: 489-494.

Bloem, E., Van Der Zee, S.E.A.T.M., Tóth, T. & Hagyó, A. (2008). Risk assessment methods of salinization. RAMSOIL Report 2.4. Available at: <http://www.ramsoil.eu> [accessed April 2010].

Bloem J. et al., (2003). Measuring soil biodiversity: experiences, impediments and research needs. *OECD expert meeting on soil erosion and soil biodiversity indicators, 25-28 March 2003, Rome, Italy*.

Bondesan M., 1985. Quadro schematico dell'evoluzione geomorfologia olocenica del territorio costiero compreso fra Adria e Ravenna, pp. 23-36. In: *Atti della Tavola Rotonda "Il Delta del Po"*, 24 novembre 1982, Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna.

Bondesan M., Favero V., Viñals M.J. (1995). New evidence on the evolution of the Po delta coastal plain during the Holocene. *Quaternary international* Vol. 29/30, 105-110.

Bongers T. (1990). The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83: 14-19.

Booth & O'halloran. (2001). A comparison of biomarker responses in *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, No. 11, pp. 2494–2502.

Borgia G., Brighenti G., Vitali D. (1982). *La coltivazione dei pozzi metaniferi del bacino polesano e ferrarese. Esame critico della vicenda*, Inarcos, Bologna.

Bray J.R., Curtis J.T. (1957). An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monography*.

Breure A. M. et al., (2003). A Biological Indicator for Soil Quality. *OECD -paper soil quality indicator*.

Buscaroli A., Pezzi G., Zannoni D. (2007). Suoli e vegetazione in una pineta litoranea. Un caso studio nella provincia di Ravenna. In *"Suolo ambiente paesaggio"*. Atti del Convegno Nazionale della Società Italiana della Scienza del Suolo. Imola, 27 - 30 giugno 2006, pp.119 – 126. Ed. Tipolitografia "F.G."

Buscaroli A., Zannoni D. (2006). I suoli delle Pinete di Classe e San Vitale. In: CIRSA Eds. "Caratteristiche ambientali del sistema delle pinete storiche ravennati di San Vitale e Classe: aggiornamento al 2006".

Buscaroli A., Zannoni D. (2010). Influence of ground water on soil salinity in the San Vitale Pinewood (Ravenna - Italy). *Agrochimica*, Vol. LIV – 5:303-320.

Calisi A., Lionetto M.G., Schettino T. (2009). Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Capowiez et al. (2010). Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. *Environmental Pollution* 158: 388–393.

Casabé et al. (2007). Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field. *J Soils Sediments* 7 (4) 232–239.

Cencini C., Cuccoli L., Fabbri P., Montanari F., Semboloni F., Torresani S., Varani L. (1979). Le spiagge di Romagna: uno spazio da proteggere, Quaderno n. 1, Lo Scarabeo, Bologna.

Chamberlain J. E., Butt K. R., (2008). Distribution of earthworms and influence of soil properties across a successional sand dune ecosystem in NW England. *European Journal of Soil Biology*, 44: 554–558.

Cencini C., Piastra S. (2007). L'evoluzione del litorale ravennate tra processi naturali ed interventi antropici: una prospettiva geografica. In: Ferrari C., Bassi Angelini C. (eds), *La selva antica di Ravenna a cento anni dalla legge Rava*. Longo Editore, Ravenna.

Ciabatti M. (1966). Ricerche sull'evoluzione del Delta Padano. *Giornale di Geologia*, 34-2, pp. 381- 410.

Ciabatti M. (1990). Geomorfologia ed evoluzione del Delta Padano. In: *Il mondo della natura in Emilia-Romagna. La pianura e la costa*. Silvana, Cinisello Balsamo.

Ciabatti M., Veggiani A. (1990). Caratteri ed evoluzione del litorale emiliano-romagnolo. In: *Il mondo della natura in Emilia-Romagna. La pianura e la costa*. Silvana, Cinisello Balsamo.

Clarke K.R. & Warwick R.M. (2001). Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK.



Codurri M., Truzzi A., Bertonazzi M.C. (2005). Microartropodi del terreno, manuale da campo per il riconoscimento dei microartropodi del terreno come indicatori della qualità biologica del suolo (metodo QBS-ar), Calvatone.

Coineau Y, Cléva R, Du Chatenet G. (1997). Ces animaux minuscules qui nous entourent. Delachaux et Niestlé.

Collange et al. (2010). Inhibition, recovery and oxime-induced reactivation of muscle esterases following chlorpyrifos exposure in the earthworm. *Environmental Pollution* 158: 2266-2272.

Cortet J. et al. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *Eur. J. Soil Biol.* 35 (3) 115-134.

Cramer V.A. and Hobbs R.J. (2005). Assessing the ecological risk from secondary salinity: A framework addressing questions of scale and threshold responses. *Austral Ecology* 30: 537–545.

D'Avino L. (2002). Esposizione del metodo di Vittorio Parisi per la valutazione della Qualità Biologica del Suolo (QBS) e proposta di standardizzazione delle procedure. Museo di Storia Naturale, Dip. di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli studi di Parma.

De Paz J.M., Visconti F., Zapata R., Sánchez J. (2004). Integration of two simple models in a geographical information system to evaluate salinization risk in irrigated land of the Valencian Community, Spain. *Soil Use and Management* 20, 3: 333–342.

Desender K and Maelfait J-P. (1999). Diversity and conservation of terrestrial arthropods in tidal marshes along the River Schelde: a gradient analysis. *Biological Conservation* 87: 221-229.

De Silva et al. (2010). Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavates*. *Applied Soil Ecology* 44: 56–60.

Detsis V. (2009). Relationships of some environmental variables to the aggregation patterns of soil microarthropod populations in forests. *European Journal of Soil Biology* 45: 409–416.

Doblas-Miranda E. et al. (2007). Soil macroinvertebrate fauna of a Mediterranean arid system: Composition and temporal changes in the assemblage. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1916–1925.

Dokuchaev V.V. (1898). Toward the Question of a Reappraisal of the Soils of European and Asiatic Russia. With a Classification of Soils, Moscow.

Doran J.W., Zeiss M.R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* 15: 3–11.

Edwards C.A. and Bohlen P.J., (1996). *Biology and Ecology of earthworms*.

European Environment Agency (1995). Soil, in: *Europe's Environment: the Dobbris Assessment*. Chapter 7.

European Environment Agency (2002). Review of sublethal ecotoxicological tests for measuring harm in terrestrial ecosystems.

Fabbri P. (ed.) (1987). *Il porto di Ravenna*, Ed. Analisi, Ravenna.

Fabbri P., Missiroli A. (1998). *Le pinete ravennati. Storia di un bosco e di una città*, Longo Editore, Ravenna.

Faith D.P., Minchin P.R., Belbin L. (1987). Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. *Vegetatio*, **69**: 57–68.

FAO, ISRIC, ISSS, 1998. *World Reference Base for Soil Resources*. World Soil Resources Report, No. 84. FAO, Rome.

FAO (2007). *The state of food and agriculture*. Disponibile sul sito: <http://www.fao.org/docrep/010/a1200e/a1200e00.htm>.

Fetter C.W. (2001). *Applied hydrogeology*, 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.

Fierotti G., Dazzi C. e Tusa D. (1999). Riflessi dell'irrigazione con acque saline sulla qualità dei suoli. Convegno POM (Programma Operativo Multiregionale) Progetto di ricerca e divulgazione "OTRIS" (Ottimizzazione dell'uso delle risorse idriche, convenzionali e non, in sistemi culturali sostenibili), Foggia.

Frampton G. K. (1999). Spatial variation in non-target effects of the insecticides chlorpyrifos, cypermethrin and pirimicarb on Collembola in winter wheat. *Pestic Sci* 55:875-886.

Frampton et al. (2006). Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 25, No. 9, pp. 2480–2489.

Gambolati G., Teatini P. (1998). Numerical analysis of land subsidence due to natural compaction of the upper Adriatic Sea basin. In: Gambolati G. (ed.) *CENAS, Coastal evolution of the upper Adriatic sea due to level sea rise and natural and anthropogenic land subsidence*. Kluwer Academic Publishing, Water Science & Technology Library, 26: 103- 131.

Gastaldi L., Ranzato E., Capri F., Hankard P., Pérès G., Canesi L., Viarengo A., Pons G. (2007). Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia Andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 (2007) 398–405.

Giambastiani B. M. S. (2006). Evoluzione idrologica ed idrogeologica della Pineta di San Vitale (Ravenna). Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali, XIX Ciclo, A/A 2006-2007, Università di Bologna.

Giordano A. (1999). *Pedologia*. Utet, Torino.

Gower J.C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*. 53: 325 – 338.

Gower J.C. (1992). Euclidean distance geometry. *Math. Scientist* 7: 1 – 14.

Guizzetti G. (1741). Ragguaglio storico della diversione dei duo fiumi il Ronco e il Montone dalla città di Ravenna, Bologna.

Guo-liang XU et al. (2006). Preliminary Response of Soil Fauna to Simulated N Deposition in Three Typical Subtropical Forests. *Pedosphere* 16(5): 596-601.

Guo-liang XU et al. (2007). Response of soil fauna to simulated nitrogen deposition: A nursery experiment in subtropical China. *Journal of Environmental Sciences* 19: 603–609.

Gupta et al. (2010). Studies on Relative Toxicities of Six Insecticides on Epigeic Earthworm, *Perionyx excavates*. *Bull Environ Contam Toxicol* 85:83–86.

Hackenberger B.K., Jaric-Perkusic D., Stepic S. (2008). Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 583–589.

Holmstrup et al. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Science of the Total Environment* 408: 3746–3762.

Huber S., Prokop G., Arrouays D., Banko G., Bispo A., Jones R.J.A., Kibblewhite M.G., ISO 11269, parte I (1993). Metodo per la misura di inibizione della crescita delle radici.

ISO 11268-1 Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Acute toxicity.

ISO 11268-2 Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Reproduction.

ISO 11268-3 Soil Quality - Effects of pollutants on earthworms - Guidance in field situations.

Jacomini C., Nappi P., Sbrilli G., Mancini L. (2000). Indicatori e indici ecotossicologici e biologici applicati al suolo. ANPA, Roma. RTI CTN\_SSC 3/2000.

Jenny H. (1941). Factors of Soil Formation. McGraw-Hill, New York.

Jones A. (lead author) (European Commission JRC); Barcelo S., Bouraoui F., Bosco C., Dewitte O., Gardi C., Hervás J., Hiederer R., Jeffery S., Montanarella L., Panagos P., Penizek V., Tóth G., Van Den Eeckhaut M., Liedekerke M.V., Verheijen F. (European Commission DG JRC); Marmo L., Köhne John Maximilian, Köhne S., Šimůnek J. (2008). A review of model applications for structured soils: a) Water flow and tracer transport. Journal of Contaminant Hydrology.

Kammenga J.E., Dallinger R., Donker M.H., Kohler H.R., Simonsen V., Triebkorn R., Weeks, J.M. (2000). Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. Reviews of environmental contamination and toxicology 164: 93-147.

Katerji N. et al. (2000). Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. Agricultural Water Management 43: 99-109.

Laskowski et al. (2010). Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors – A meta-analysis and case studies. Science of the Total Environment 408: 3763–3774.

Leone A.P. et al. (2007). A field experiment on spectrometry of crop response to soil salinity. Agricultural water management 89: 39-48.

Lercari D., Defeo O. (2006). Large-scale diversity and abundance trends in sandy beach macrofauna along full gradients of salinity and morphodynamics. Estuarine, Coastal and Shelf Science 68: 27-35.

Lexer W., Möller A., Rickson R.J., Shishkov T., Stephens M., Toth G., Van den Akker J.J.H., Varallyay G., Verheijen F.G.A., Jones A.R. (eds.) (2008). Environmental Assessment of Soil for Monitoring. Vol. I Indicators and Criteria. EUR 23490 EN/1. Office for the Official Publication of the European Communities, Luxembourg.

Lakhdar Abdelbasset et al. (2008). Application of municipal solid waste compost reduces the negative effects of saline water in *Hordeum maritimum* L. Bioresource Technology 99: 7160–7167.

Latella L., Gobbi M. (2008). La fauna del suolo: tassonomia, ecologia e metodi di studio dei principali gruppi di invertebrati terrestri italiani, Museo Tridentino Scienze Naturali.

Lavelle P. (1997). Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research*, 27: 93-132.

Legendre P. & Legendre L. (1998 c). *Numerical ecology*, 2 english ed., Elsevier, Amsterdam.

Maffiotti A. & Bona F. (1997). Introduzione all'ecotossicologia. In: Bona F., Maffiotti A. e Volterra L. (eds). *Analisi e recupero dei sedimenti marini. Quaderni di tecniche di protezione ambientale*. Pitagora Editrice Bologna.

McInnis R. (1995). Nematode Toxicity Assay using *Panagrellus redivivus*. National Water Research Institute. Burlington, Canada.

Menta C. (2008). Guida alla conoscenza della biologia e dell'ecologia del suolo. Funzionalità, diversità biologica, indicatori, Perdisa, Oasi Alberto.

Miani N., Skert N., Grahonja R. (2004). Biomonitoraggio sperimentale del suolo tramite il metodo della Qualità Biologica del Suolo (QBS) e coleotteri terrestri quali bioaccumulatori di Ipa. Convenzione per il Biomonitoraggio stipulata tra ARPA FVG e Provincia di Trieste. Campagna di rilevamento 2004.

Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-being. Synthesis*. Island Press, Washington D.C.

MiPAF, Osservatorio Nazionale Pedologico per la Qualità del suolo, 2000. *Metodi di Analisi Chimica del Suolo*. Collana di metodi analitici per l'agricoltura diretta da Paolo Sequi. Franco Angeli Ed.

Nardi S. (1987). Le bonifiche nel secolo XIX e la Cassa di colmata del Lamone. In: *Costruire un territorio - Cartografia e fotografia delle bonifiche ravennati*. Longo Editore, Ravenna.

Nuria R. et al. (2011). IBQS: A synthetic index of soil quality based on soil macro-invertebrate communities. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 2032-2045.

OECD, Organization for Economy Co-operation and Development (1984). *OECD guideline for the testing of chemicals. Earthworm acute toxicity test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. No 207. Paris, France.

OECD, Organization for Economy Co-operation and Development (2004). *OECD guideline for the testing of chemicals. Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. No 222. Paris, France.

Olazábal C., Strassburger T., Viestova E. (DG ENV); Erhard M., Iversen C., Lükewille A., Petersen J.-E. (EEA contributors) (2010). *The European Environment State and Outlook 2010. Soil*. European Environment Agency, Kongens Nytorv 61050, Copenhagen, Denmark.

Owojori O.J., Reinecke A.J., Rozanov A.B. (2008). Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2385-2393.

Owojori O. J. et al. (2009). Comparative study of the effects of salinity on life-cycle parameters of four soil-dwelling species (*Folsomia candida*, *Enchytraeus doerjesi*, *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*). *Pedobiologia* 52: 351—360.

Owojori O.J., Reinecke A.J., Rozanov A.B. (2009). The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology* 41: 277-285.

Parisi V. (2001). The Biological Quality of soil. A Method Based on Microarthropods. *Acta Naturalia de «L'Ateneo Parmense»*, 37, nn. 3/4: 105-114.

Parisi V., Menta C., Gardi C., Jacomini C., Mozzanica E., (2005) – “Microarthropod communities as a tool to assess soil quality and biodiversity: a new approach in Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment* .05: 323-333.

Pellegrini M., Tellini C. (2000). L'origine della pianura padana. In: Ferrari C., Gambi L. (eds), *Un Po di terra, Diabasis, Città di Castello*.

Petillon J. et al. (2007). Influence of abiotic factors on spider and ground beetle communities in different salt-marsh systems. *Basic and Applied Ecology*.

Piazzi M., 1988. I suoli delle principali formazioni geomorfologiche della Pineta di S. Vitale. Tesi di laurea in Scienze Forestali. A.A. 1987/1988. Università di Torino.

Piccoli F., Corticelli S., Merloni N. (1999). Carta della vegetazione del Parco Regionale del Delta del Po. Stazione Pineta di San Vitale e Piallasse di Ravenna in scala 1:25000. Selca, Firenze.

Pokarzhevskii A.D. (1996). The problem of scale in bioindication of soil contamination. In: Van Straalen N.M. & Krivolutsky D.A. (Eds), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL.

Preti M., 2000. Eustatismo, subsidenza e linee di intervento per la difesa del territorio costiero in Emilia-Romagna. *Mare e cambiamenti globali*, ICRAM, ARPA – Ingegneria Ambientale, Bologna.

Rao J. V. et al. (2003). Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 296–301.

Regione Emilia-Romagna (1994). I suoli dell'Emilia-Romagna. Note illustrative. Servizio cartografico, Ufficio pedologico. Grafiche Zanini. Bologna.

Regione Emilia-Romagna (1999). Note illustrative Carta Geologica d'Italia. Scala 1:50000. Ravenna. Amorosi A. (ed.), Ist. Poligrafico e Zecca dello Stato Ed., Roma.

Reinecke & Reinecke (2007). Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 92–101.

Reinecke & Reinecke (2007). The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66: 244–251.

Ricci Lucchi F., Ciabatti M., Pellegrini M., Veggiani A. (1990). Evoluzione geologica della pianura. In: *Il mondo della natura in Emilia-Romagna. La pianura e la costa*. Silvana, Cinisello Balsamo.

Roncuzzi A. (1994). Storia idrogeologica della piallassa Baiona. In: Soprani S. & Ricci C. *Analisi dello stato ambientale e sanitario nelle valli ravennati. La Piallassa Baiona*. Azienda U.S.L. Dipartimento dei Servizi di Prevenzione, Ravenna.

Sandri G., 1954. I terreni delle dune antiche del Delta Padano. *L'Italia Forestale e Montana*, IX: 34-40.

Sandri G., 1956. I terreni delle pinete di S. Vitale e di Classe (Ravenna). *Annali dell'Accademia Italiana di Scienze Forestali*, XI: 295-313.

Sandri G., Casalicchio G., 1970. Il contenuto di boro nei terreni sabbiosi del litorale ferrarese-ravennate. *Annali dell'Accademia Nazionale di Agricoltura*, fasc. 3, serie IV, v. XC, pp. 265-276, Bologna.

Sandri G., 1974. Caratteristiche pedologiche dei terreni della Pineta di S.Vitale. In: *Influenza di insediamenti industriali sul circostante ambiente naturale - Studio sulla Pineta di San Vitale di Ravenna*. Editrice Compositori, Bologna.

Sbaraglia M., Lucci E. (1994). Guida all'interpretazione delle analisi del terreno ed alla fertilizzazione. Studio Pedon, Pomezia, Roma.

Scossiroli R.E. (1974). Influenza di insediamenti industriali sul circostante ambiente naturale. *Studio sulla Pineta di San Vitale di Ravenna*. Editrice Compositori, Bologna.

Selvaradjou S.K. (2004). Reports of the technical Working Groups established under the thematic strategy for soil protection. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. EUR 21319 EN/3.

Simeoni U., Atzeni P., Bonora N., Borasio E., Del Grande C., Gabbianelli G., Gonella M., Tessari U., Valpreda E., Zamariolo A. (2002). Integrated Management Study of Comacchio Coast (Italy). *Journal of Coastal Research* 36: 686-693.

Sinclair Brent J. and Heidi Sjursen (2001). Terrestrial invertebrate abundance across a habitat transect in Keble Valley, Ross Island, Antarctica. *Pedobiologia* 45:134–145.

SoCo Project Team (2009). Louwagie G., Gay S.H., Burrell A. (eds) Addressing soil degradation in EU agriculture: relevant processes, practices and policies. Report on the project 'Sustainable Agriculture and Soil Conservation (SoCo)'. EUR 23767 EN – 2009.

Soil Survey Division Staff (1993). Soil survey manual. Soil Conservation Service. Handbook 18. U.S. Department of Agriculture.

Soil Survey Staff (2003). Keys to Soil Taxonomy, 9th ed., USDA - NRCS, Washington D.C.

Soil Survey Staff. (2006). Keys to Soil Taxonomy, 10th ed., USDA- NRCS, Washington, D.C.

Sonmez S., Buyuktas D., Okturen F., Citak S. (2008). Assessment of different soil to water ratios (1:1, 1:2.5, 1:5) in soil salinity studies. *Geoderma* 144: 361–369.

Talarico F., Romeo M., Mazzei A., Brandmayr T.Z., Brandmayr P. (2005). Valutazione della qualità biologica del suolo (QBS) in un agrumeto della provincia di Vibo Valentia. Dipartimento di Ecologia, Università della Calabria, 87036 Arcavacata di Rende (CS), Italia. SItE.

Teatini P., Ferronato M., Gambolati G., Bretoni W., Gonnella M. (2005). A century of land subsidence in Ravenna, Italy. *Environ. Geol.*, 47: 831-846.

Todd D.K. (1953). Sea water intrusion in coastal aquifers. *Am. Geophys Union Trans.* 34:749–754.

UNI EN (1993). Qualità dell'acqua. Prova di inibizione della crescita di alghe di acqua dolce con *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum*. UNI EN 28692.

USDA (1954). Saline and alkaly soils. Agriculture handbook n. 60. United States Salinity Laboratory Staff. US Government Printing Office. Washington. USA.

Várallyay G. (2006). Salinisation/Sodification and Soil Compaction. 4th JRC International School on Soil Survey, Ispra, Varese, Italy, 28 August 2006. Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry (RISSAC) of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.



Veggiani A. (1974). Le ultime vicende geologiche del Ravennate. In: Scossiroli R.E. (ed.), *Influenza di insediamenti industriali sul circostante ambiente naturale. Studio sulla Pineta di San Vitale di Ravenna*. Editrice Compositori, Bologna.

Velasquez E., Lavelle P., Andrade M. (2007). GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 3066–3080.

Venkateswara Rao J. et al. (2003). Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 296–301.

Wahla Intkhab Hazoor, Kirkham M.B., (2008). Heavy metal displacement in salt-water-irrigated soil during phytoremediation. *Environmental Pollution* 155: 271-283.

Yaron B., Dror I., Berkowitz B. (2008). Contaminant-induced irreversible changes in properties of the soil–vadose–aquifer zone: An overview. *Chemosphere* 71: 1409–1421.

Zanella A., Jabiol B., Ponge J.F., Sartori G., De Waal R., Van Delft B., Graefe U., Cools N., Katzensteiner K., Hager H., Englisch M., Brethes A., Broll G., Gobat J.M., Brun J.J., Milbert G., Kolb E., Wolf U., Frizzera L., Galvan P., Kolli R., Baritz R., Kemmers R., Vacca A., Serra G., Banas D., Garlato A., Chersich S., Klimo E., Langohr R. (2011).

Zangheri P. (1936). *Flora e vegetazione delle Pinete di Ravenna e dei territori limitrofi fra queste e il mare*, Tip. Valbonesi, Forlì.

Zhou Shi-ping et al. (2007). Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences* 19: 854–858.

# APPENDICE

Tab.T1: QBS-ar max SV transetto 1 primavera:

	ISVA		ISVB		ISVC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20			20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1	1			1
	5				
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20	20			20
Paupodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10	10			10
	20				
Proturi	20				
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1			1
Coleotteri (*)	1				
	+ 4				
	+ 5				
	+ 5				
	+ 5				
	20				
Imenotteri	1				
	5	5		5	5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10		10		10
Ditteri (larve)	10	10	10		10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1	1			1
<b>QBS</b>		<b>108</b>	<b>60</b>	<b>45</b>	<b>118</b>

Tab.T2: QBS-ar max CER transetto 1 primavera:

	ICERA		ICERB		ICERC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Aranei	1				
	5	5			5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20			20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigantomi	10				
Dermatofili	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1		1
Coleotteri (*)	1	1		1	
	+ 4				
	+ 5	5		5	
	+ 5			5	
	+ 5				
	20	6		11	11
Imenotteri	1				
	5			5	5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10		10
Ditteri (larve)	10	10		10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>98</b>	<b>71</b>	<b>117</b>	<b>122</b>

Tab.T3: QBS-ar max PIR transetto 1 primavera:

	IPIRA		IPIRB		IPIRC	QBS-ar max
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica		
Pseudoscorpioni	20					
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilioni	10					
Araneidi	1					
	5	5		5		5
Acari	20	20	20	20		20
Isopodi	10					
Diplopodi	10		10			
	20	20				20
Paupodi	20					
Sinfili	20					
Chilopodi	10					
	20					
Proturi	20	20				20
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8					
	10					
	20	20	20	20		20
Microcorifi	10					
Zigotomi	10					
Dermatari	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5					
Psocotteri	1					
Emitteri	1					
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1	1	1	1		1
Coleotteri (*)	1		1			
	+ 4		4			
	+ 5		5			
	+ 5					
	+ 5					
	20		10			10
Imenotteri	1					
	5					
Ditteri	1					
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10	10				10
Ditteri (larve)	10	10	10	10		10
Imenotteri (larve)	10					
Lepidotteri (larve)	10	10				10
Altri olometaboli	1					
<b>QBS</b>		<b>116</b>	<b>81</b>	<b>56</b>		<b>126</b>

Tab.T4: QBS-ar max SV transetto 2 primavera:

	2SVA		2SVB		2SVC	QBS-ar max
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica		
Pseudoscorpioni	20					
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilionidi	10					
Araneidi	1		1			1
	5					
Acari	20	20	20	20		20
Isopodi	10					
Diplopodi	10					
	20					
Paupodi	20					
Sinfili	20					
Chilopodi	10					
	20					
Proturi	20	20		20		20
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8		8			
	10					
	20	20		20		20
Microcorifi	10					
Zigentomi	10					
Dermatteri	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5					
Psocotteri	1					
Emitteri	1					
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1	1		1		1
Coleotteri (*)	1			1		
	+ 4					
	+ 5			5		
	+ 5			5		
	+ 5					
	20			11		11
Imenotteri	1					
	5					
Ditteri	1			1		1
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10	10		10		10
Ditteri (larve)	10	10	10	10		10
Imenotteri (larve)	10					
Lepidotteri (larve)	10					
Altri olometaboli	1					
<b>QBS</b>		<b>81</b>	<b>39</b>	<b>104</b>		<b>94</b>

Tab.T5: QBS-ar max CER transetto 2 primavera:

		2CERA	2CERB	2CERC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20			20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Aranei	1				
	5		5		5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10	10			10
Diplopodi	10				
	20	20		20	20
Paupodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10	10	10		10
	20				
Proturi	20				
Dipluri	20		20		20
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigotomi	10				
Dermatofiti	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1			1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4			4	
	+ 5	5		5	
	+ 5	5			
	+ 5				
	20	11	1	10	11
Imenotteri	1				
	5	5	5		5
Ditteri	1		1		1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10	10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10			10	10
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS		128	103	130	173

Tab.T6: QBS-ar max PIR transetto 2 primavera:

	2PIRA		2PIRB	2PIRC	QBS-ar max
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Aranei	1				
	5	5		5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20				
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20				
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4		4		
	6				
	8				
	10			10	
	20	20			20
Microcorifi	10				
Zigantomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1			1	1
Coleotteri (*)	1	1		1	
	+ 4	4			
	+ 5	5		5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	10		6	10
Imenotteri	1				
	5	5		5	5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10			10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1			1	1
<b>QBS</b>		<b>80</b>	<b>34</b>	<b>74</b>	<b>82</b>

Tab.T7: QBS-ar max SV transetto 3 primavera:

	EMI	3SVA	3SVB	3SVC	QBS-ar max
		1a replica	2a replica	3a replica	
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1	1	1		1
	5				
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Paupodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20				
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20		20
Microcorifi	10				
Zigotomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1			1	1
Coleotteri (*)	1				
	+ 4				
	+ 5				
	+ 5				
	+ 5				
	20				
Imenotteri	1				
	5	5	5	5	5
Ditteri	1			1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10				
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>76</b>	<b>76</b>	<b>57</b>	<b>78</b>



Tab.T8: QBS-ar max CER transetto 3 primavera:

	3CERA		3CERB	3CERC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20		20		20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1				
	5		5		5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20		20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20	20	20		20
Dipluri	20	20			20
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1			1
Coleotteri (*)	1				
	+ 4				
	+ 5				
	+ 5				
	+ 5				
	20				
Imenotteri	1				
	5	5		5	5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10	10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS		106	125	85	151

Tab. T9: QBS-ar max PIR transetto 3 primavera:

	3PIRA		3PIRB	3PIRC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20			20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1	1		1	1
	5				
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10		10	10	10
Diplopodi	10			10	10
	20				
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20	20			20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10	10		10	
	20		20		20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1		1		1
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1				
Coleotteri <sup>(*)</sup>	1			1	
	+ 4				
	+ 5			5	
	+ 5				
	+ 5				
	20			6	6
Imenotteri	1				
	5	5	5	5	5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10			10
Ditteri (larve)	10	10		10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS		76	56	98	133

Tab. T10: QBS-ar max SV transetto 4 primavera:

	4SVA		4SVB		4SVC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20			20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Aranei	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20		20	20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigotomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmidei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1	1	1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4				
	+ 5	5		5	
	+ 5	5		5	
	+ 5				
	20	11	1	11	11
Imenotteri	1				
	5				
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10		10	10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>98</b>	<b>108</b>	<b>148</b>	<b>137</b>

Tab. T11: QBS-ar max CER transetto 4 primavera:

	EMI	4CERA	4CERB	4CERC	QBS-ar max
		1a replica	2a replica	3a replica	
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5			5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10	10		10	
	20		20		20
Pauropodi	20				
Sinfili	20	20		20	20
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20		20	20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1			1
Coleotteri (*)	1			1	
	+ 4			4	
	+ 5			5	
	+ 5			5	
	+ 5				
	20			15	15
Imenotteri	1				
	5				
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10				
Ditteri (larve)	10	10	10		10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>81</b>	<b>90</b>	<b>125</b>	<b>131</b>

Tab. T12: QBS-ar max PIR transetto 4 primavera:

		4PIRA	4PIRB	4PIRC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20		20		20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Aranei	1				
	5		5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10			10	10
Diplopodi	10	10			
	20		20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20	20		20	20
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20	20	20	20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigotomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1				
Coleotteri (*)	1		1	1	
	+ 4				
	+ 5		5		
	+ 5		5	5	
	+ 5				
	20		11	6	11
Imenotteri	1				
	5		5	5	5
Ditteri	1			1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10			10	10
Ditteri (larve)	10	10	10		10
Imenotteri (larve)	10			10	10
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS		100	142	153	182

Tab. T13: QBS-ar max SV transetto 5 primavera:

	5SVA		5SVB	5SVC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5				
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10		10		
	20			20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20	20			20
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20	20	20		20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1	1	1
Coleotteri (*)	1	1			
	+ 4				
	+ 5	5			
	+ 5	5			
	+ 5				
	20	11			11
Imenotteri	1				
	5		5		5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10				
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS		113	86	71	127

Tab. T14: QBS-ar max CER transetto 5 primavera:

	5CERA		5CERB		5CERC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20	20		20	20
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20	20	20	20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigantomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1			1	1
Coleotteri (*)	1			1	
	+ 4			4	
	+ 5			5	
	+ 5			5	
	+ 5				
	20			15	15
Imenotteri	1				
	5	5		5	5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10		10		10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>120</b>	<b>105</b>	<b>151</b>	<b>146</b>

Tab. T15: QBS-ar max PIR transetto 5 primavera:

	SPIRA		SPIRB		SPIRC	QBS-ar max
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica		
Pseudoscorpioni	20		20			20
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilioni	10					
Aranei	1					
	5	5		5		5
Acari	20	20	20	20		20
Isopodi	10	10	10			10
Diplopodi	10					
	20					
Paupodi	20					
Sinfili	20	20	20			20
Chilopodi	10					
	20					
Proturi	20	20				20
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8					
	10					
	20	20	20	20		20
Microcorifi	10					
Zigotomi	10					
Dermatari	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5					
Psocotteri	1					
Emitteri	1					
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1	1	1			1
Coleotteri (*)	1	1	1	1		
	+ 4		4	4		
	+ 5		5	5		
	+ 5			5		
	+ 5					
	20	1	10	15		15
Imenotteri	1					
	5					
Ditteri	1		1	1		1
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10			10		10
Ditteri (larve)	10	10	10	10		10
Imenotteri (larve)	10					
Lepidotteri (larve)	10					
Altri olometaboli	1					
<b>QBS</b>		<b>108</b>	<b>122</b>	<b>96</b>		<b>152</b>



Tab. T16: QBS-ar max SV transetto 6 primavera:

	6SVA		6SVB		6SVC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max	
Pseudoscorpioni	20	20		20	20	
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilioni	10					
Araneidi	1					
	5	5	5		5	
Acari	20	20	20	20	20	
Isopodi	10					
Diplopodi	10		10	10		
	20	20			20	
Paupodi	20					
Sinfili	20			20	20	
Chilopodi	10					
	20					
Proturi	20	20			20	
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8					
	10					
	20	20	20	20	20	
Microcorifi	10					
Zigotomi	10					
Dermatari	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5					
Psocotteri	1					
Emitteri	1	1		1	1	
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1	1	1	1	1	
Coleotteri (*)	1					
	+ 4					
	+ 5					
	+ 5					
	+ 5					
	20					
Imenotteri	1					
	5	5	5		5	
Ditteri	1					
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10	10	10	10	10	
Ditteri (larve)	10	10	10		10	
Imenotteri (larve)	10	10			10	
Lepidotteri (larve)	10					
Altri olometaboli	1					
<b>QBS</b>		<b>142</b>	<b>81</b>	<b>102</b>	<b>162</b>	

Tab. T17: QBS-ar max CER transetto 6 primavera:

	6CERA		6CERB		6CERC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Aranei	1				
	5	5		5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10				
	20		20	20	20
Paupodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20			20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigotomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1	1			1
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1		1	1
Coleotteri (*)	1	1	1		
	+ 4				
	+ 5		5		
	+ 5				
	+ 5				
	20	1	6		6
Imenotteri	1				
	5	5			5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10			10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>74</b>	<b>82</b>	<b>96</b>	<b>118</b>

Tab. T18: QBS-ar max PIR transetto 6 primavera:

	EMI	6PIRA	6PIRB	6PIRC	QBS-ar max
		1a replica	2a replica	3a replica	
Pseudoscorpioni	20				
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5	5			5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10		10		10
	20				
Paupodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10			10	10
	20				
Proturi	20				
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1		1		1
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1		1		1
Coleotteri (*)	1	1		1	
	+ 4				
	+ 5	5			
	+ 5				
	+ 5				
	20	6		1	6
Imenotteri	1	1			
	5			5	5
Ditteri	1		1		1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10		10
Ditteri (larve)	10		10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS		68	73	67	99

Tab. T19: QBS-ar max SV transetto 1 estate:

	ISVA		ISVB	ISVC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20		20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20				
Isopodi	10				
Diplopodi	10	10	10	10	10
	20				
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20	20	20	20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1	1			
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1	1	1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4	4	4	4	
	+ 5	5	5	5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	10	10	10	10
Imenotteri	1				
	5	5	5	5	5
Ditteri	1	1		1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10			10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10		10	10	10
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS		123	121	102	122

Tab. T20: QBS-ar max CER transetto 1 estate:

	1CERA		1CERB	1CERC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1		1		
	5	5		5	5
Acari	20	20	20		20
Isopodi	10				
Diplopodi	10	10	10		
	20		20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20			20	20
Proturi	20	20	20	20	20
Dipluri	20		20		20
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1	1	1	1	1
Emitteri	1			1	
	10	10			10
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1		1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4	4	4	4	
	+ 5	5	5	5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	10	10	10	10
Imenotteri	1		1		
	5		5		5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10		10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS-ar		147	169	147	192

Tab. T21: QBS-ar max PIR transetto 1 estate:

	1PIRA		1PIRB		1PIRC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1				
	5				
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10	10		10	
	20		20		20
Pauropodi	20				
Sinfili	20	20			20
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20	20	20	20	20
Dipluri	20		20		20
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5		5		5
Psocotteri	1		1		1
Emitteri	1	1	1		1
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1			1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4	4	4	4	
	+ 5	5	5	5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	10	10	10	10
Imenotteri	1				
	5			5	5
Ditteri	1	1	1		1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10		10	10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>143</b>	<b>168</b>	<b>135</b>	<b>184</b>

Tab. T22: QBS-ar max SV transetto 2 estate:

	2SVA		2SVB		2SVC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10				
Diplopodi	10	10			
	20	20	20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20		20		20
Chilopodi	10	10	10		10
	20				
Proturi	20		20	20	20
Dipluri	20			20	20
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigantomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1	1			1
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1		1	1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4		4	4	
	+ 5		5	5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	1	10	10	10
Imenotteri	1			1	
	5	5	5	5	5
Ditteri	1	1		1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10		10		10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>125</b>	<b>180</b>	<b>163</b>	<b>193</b>

Tab. T23: QBS-ar max CER transetto 2 estate:

		2CERA	2CERB	2CERC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10	10	10		10
Diplopodi	10	10			
	20	20		20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20	20	20	20	20
Chilopodi	10		10	10	
	20	20			20
Proturi	20	20			20
Dipluri	20		20		20
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1			1	1
Emitteri	1		1	1	1
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1		1	1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4		4	4	
	+ 5		5		
	+ 5				
	+ 5				
	20	1	10	5	10
Imenotteri	1				
	5		5	5	5
Ditteri	1	1		1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10	10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>189</b>	<b>171</b>	<b>154</b>	<b>214</b>



Tab. T24: QBS-ar max PIR transetto 2 estate:

	2PIRA		2PIRB	2PIRC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20		20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10		10		10
Araneidi	1		1	1	
	5		5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10		10	10	10
Diplopodi	10			10	10
	20				
Pauropodi	20				
Sinfili	20		20		20
Chilopodi	10			10	
	20		20		20
Proturi	20	20		20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1			1	1
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1	1	1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4		4		
	+ 5				
	+ 5				
	+ 5				
	20	1	5	1	5
Imenotteri	1				
	5		5	5	5
Ditteri	1		1		1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10		10		10
Ditteri (larve)	10	10	10		10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
OBS		73	163	125	188

Tab. T25: QBS-ar max SV transetto 3 estate:

	3SVA		3SVB	3SVC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10		10	10	10
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20		20	20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1		1	1	1
Emitteri	1		1	1	1
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1		1
Coleotteri (*)	1	1		1	
	+ 4			4	
	+ 5			5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	1	0	10	10
Imenotteri	1				
	5	5	5	5	5
Ditteri	1				
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10		10
Ditteri (larve)	10	10		10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
OBS		113	133	152	153

Tab. T26: QBS-ar max CER transetto 3 estate:

	3CERA		3CERB	3CERC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20		20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10			10	10
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20			20	20
Chilopodi	10				
	20		20	20	20
Proturi	20	20			20
Dipluri	20		20	20	20
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1	1		1	1
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1	1	1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4	4	4	4	
	+ 5	5	5	5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	10	10	10	10
Imenotteri	1				
	5	5	5	5	5
Ditteri	1	1		1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10		10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
OBS		133	171	193	213

Tab. T27: QBS-ar max PIR transetto 3 estate:

	3PIRA		3PIRB		3PIRC	QBS-ar max
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica		
Pseudoscorpioni	20					
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilionidi	10					
Araneidi	1	1		1		1
	5					
Acari	20	20	20	20		20
Isopodi	10		10	10		10
Diplopodi	10		10			
	20	20		20		20
Pauropodi	20					
Sinfili	20	20		20		20
Chilopodi	10					
	20					
Proturi	20	20	20			20
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8	8				
	10					
	20		20	20		20
Microcorifi	10					
Zigentomi	10					
Dermatteri	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5					
Psocotteri	1					
Emitteri	1		1			1
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1		1	1		1
Coleotteri (*)	1	1	1	1		
	+ 4	4	4	4		
	+ 5	5	5	5		
	+ 5					
	+ 5					
	20	10	10	10		10
Imenotteri	1	1				
	5	5	5			5
Ditteri	1			1		1
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10		10			10
Ditteri (larve)	10		10	10		10
Imenotteri (larve)	10					
Lepidotteri (larve)	10					
Altri olometaboli	1					
<b>QBS</b>		<b>105</b>	<b>127</b>	<b>123</b>		<b>149</b>

Tab. T28: QBS-ar max SV transetto 4 estate:

	4SVA		4SVB		4SVC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max	
Pseudoscorpioni	20		20	20	20	
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilioni	10					
Araneidi	1					
	5	5	5	5	5	
Acari	20	20	20	20	20	
Isopodi	10	10	10			10
Diplopodi	10	10		10		
	20		20			20
Pauropodi	20					
Sinfili	20	20		20		20
Chilopodi	10			10		10
	20					
Proturi	20		20			20
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8					
	10					
	20	20	20	20		20
Microcorifi	10					
Zigotomi	10					
Dermatteri	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5					
Psocotteri	1	1	1	1		1
Emitteri	1		1	1		1
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1	1	1	1		1
Coleotteri (*)	1			1		
	+ 4			4		
	+ 5			5		
	+ 5					
	+ 5					
	20			10		10
Imenotteri	1			1		
	5		5			5
Ditteri	1	1				1
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10	10	10	10		10
Ditteri (larve)	10			10		10
Imenotteri (larve)	10					
Lepidotteri (larve)	10					
Altri olometaboli	1					
<b>QBS</b>		<b>98</b>	<b>133</b>	<b>149</b>		<b>184</b>

Tab. T29: QBS-ar max CER transetto 4 estate:

	4CERA		4CERB	4CERC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10		10		10
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Paupropodi	20				
Sinfili	20	20	20	20	20
Chilopodi	10				
	20			20	20
Proturi	20	20	20	20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigotomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1	1			1
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1		1	1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4			4	
	+ 5			5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	1	1	10	10
Imenotteri	1			1	1
	5				
Ditteri	1			1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10	10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
QBS		149	157	188	189

Tab. T30: QBS-ar max PIR transetto 4 estate:

	4PIRA		4PIRB		4PIRC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10	10			10
Araneidi	1				
	5	5	5		5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10	10	10	10	10
Diplopodi	10				
	20	20	20		20
Pauropodi	20				
Sinfili	20	20	20	20	20
Chilopodi	10				
	20		20		20
Proturi	20	20		20	20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1			1	1
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1				
Coleotteri (*)	1	1	1		
	+ 4				
	+ 5		5		
	+ 5				
	+ 5				
	20	1	6		6
Imenotteri	1				
	5		5		5
Ditteri	1		1	1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10				
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>157</b>	<b>163</b>	<b>122</b>	<b>188</b>

Tab. T31: QBS-ar max SV transetto 5 estate:

	5SVA		5SVB	5SVC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20		20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10	10	10		10
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Paupopodi	20				
Sinfili	20	20	20	20	20
Chilopodi	10	10	10		10
	20				
Proturi	20	20			20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1	1	1		1
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1		1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4	4	4	4	
	+ 5	5	5	5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	10	10	10	10
Imenotteri	1				
	5	5	5	5	5
Ditteri	1	1	1		1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10		10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
OBS		193	173	120	183



Tab. T32: QBS-ar max CER transetto 5 estate:

	5CERA		5CERB		5CERC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max	
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20	
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilioni	10					
Araneidi	1					
	5	5	5	5	5	
Acari	20	20	20	20	20	
Isopodi	10					
Diplopodi	10					
	20	20	20	20	20	
Pauropodi	20					
Sinfili	20	20	20	20	20	
Chilopodi	10		10	10	10	
	20					
Proturi	20	20	20		20	
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8					
	10					
	20	20	20	20	20	
Microcorifi	10					
Zigantomi	10					
Dermatteri	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5					
Psocotteri	1					
Emitteri	1		1	1	1	
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1	1	1		1	
Coleotteri (*)	1	1	1	1		
	+ 4	4	4	4		
	+ 5	5	5	5		
	+ 5					
	+ 5					
	20	10	10	10	10	
Imenotteri	1		1			
	5	5		5	5	
Ditteri	1		1		1	
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10		10	10	10	
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10	
Imenotteri (larve)	10					
Lepidotteri (larve)	10					
Altri olometaboli	1					
<b>QBS</b>		<b>161</b>	<b>179</b>	<b>161</b>	<b>173</b>	

Tab. T33: QBS-ar max PIR transetto 5 estate:

	SPIRA		SPIRB		SPIRC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max	
Pseudoscorpioni	20	20	20		20	
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilioni	10					
Aranei	1					
Acari	5	5	5	5	5	
Isopodi	20	20	20	20	20	
Diplopodi	10	10	10	10	10	
	20	20	20		20	
Pauropodi	20					
Sinfili	20		20		20	
Chilopodi	10					
	20	20			20	
Proturi	20	20	20		20	
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8			8		
	10					
	20	20	20		20	
Microcorifi	10					
Zigentomi	10					
Dermatteri	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5					
Psocotteri	1	1			1	
Emitteri	1		1	1	1	
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1	1		1	1	
Coleotteri <sup>(*)</sup>	1	1	1	1		
	+ 4	4		4		
	+ 5					
	+ 5					
	+ 5					
	20	5	1	5	5	
Imenotteri	1					
	5	5	5	5	5	
Ditteri	1	1			1	
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10					
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10	
Imenotteri (larve)	10					
Lepidotteri (larve)	10					
Altri olometaboli	1					
QBS		163	153	70	179	

Tab. T34: QBS-ar max SV transetto 6 estate:

	6SVA		6SVB		6SVC	
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max	
Pseudoscorpioni	20	20	20	20	20	
Scorpioni	10					
Palpigradi	20					
Opilionidi	10					
Araneidi	1					
	5	5	5	5	5	
Acari	20	20	20	20	20	
Isopodi	10					
Diplopodi	10		10	10		
	20		20	20	20	
Pauropodi	20					
Sinfili	20			20	20	
Chilopodi	10					
	20					
Proturi	20					
Dipluri	20					
Collemboli	1					
	2					
	4					
	6					
	8					
	10					
	20	20	20	20	20	
Microcorifi	10					
Zigentomi	10					
Dermatteri	1					
Ortotteri	1					
	20					
Embiotteri	10					
Fasmodei	1					
Mantodei	1					
Mecotteri	1					
Isotteri	10					
Blattari	5		5		5	
Psocotteri	1		1	1	1	
Emitteri	1		1		1	
	10					
Rafidiotteri	1					
Tisanotteri	1		1	1	1	
Coleotteri (*)	1	1	1	1		
	+ 4	4	4	4		
	+ 5			5		
	+ 5					
	+ 5					
	20	5	5	10	10	
Imenotteri	1			1		
	5		5		5	
Ditteri	1		1		1	
Rafidiotteri (larve)	10					
Planipenni (larve)	1					
Mecotteri (larve)	10					
Coleotteri (larve)	10		10	10	10	
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10	
Imenotteri (larve)	10					
Lepidotteri (larve)	10					
Altri olometaboli	1					
<b>QBS</b>		<b>85</b>	<b>139</b>	<b>158</b>	<b>149</b>	

Tab. T35: QBS-ar max CER transetto 6 estate:

	6CERA		6CERB		6CERC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20	20	20		20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilioni	10				
Araneidi	1				
	5	5	5		5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10			10	10
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20			20	20
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20		20		20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigotomi	10				
Dermatari	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1				
Emitteri	1	1	1	1	1
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1			1
Coleotteri (*)	1	1	1		
	+ 4	4	4		
	+ 5	5	5		
	+ 5				
	+ 5				
	20	10	10		10
Imenotteri	1			1	
	5	5	5		5
Ditteri	1	1			1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10			10
Ditteri (larve)	10	10		10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>133</b>	<b>131</b>	<b>102</b>	<b>173</b>

Tab. T36: QBS-ar max PIR transetto 6 estate:

	6PIRA		6PIRB		6PIRC
	EMI	1a replica	2a replica	3a replica	QBS-ar max
Pseudoscorpioni	20		20	20	20
Scorpioni	10				
Palpigradi	20				
Opilionidi	10				
Araneidi	1				
	5	5	5	5	5
Acari	20	20	20	20	20
Isopodi	10		10	10	10
Diplopodi	10				
	20	20	20	20	20
Pauropodi	20				
Sinfili	20				
Chilopodi	10				
	20				
Proturi	20	20	20		20
Dipluri	20				
Collemboli	1				
	2				
	4				
	6				
	8				
	10				
	20	20	20	20	20
Microcorifi	10				
Zigentomi	10				
Dermatteri	1				
Ortotteri	1				
	20				
Embiotteri	10				
Fasmodei	1				
Mantodei	1				
Mecotteri	1				
Isotteri	10				
Blattari	5				
Psocotteri	1			1	1
Emitteri	1				
	10				
Rafidiotteri	1				
Tisanotteri	1	1	1	1	1
Coleotteri (*)	1	1	1	1	
	+ 4			4	
	+ 5	5	5	5	
	+ 5				
	+ 5				
	20	6	6	10	10
Imenotteri	1				
	5	5		5	5
Ditteri	1	1	1	1	1
Rafidiotteri (larve)	10				
Planipenni (larve)	1				
Mecotteri (larve)	10				
Coleotteri (larve)	10	10	10	10	10
Ditteri (larve)	10	10	10	10	10
Imenotteri (larve)	10				
Lepidotteri (larve)	10				
Altri olometaboli	1				
<b>QBS</b>		<b>124</b>	<b>149</b>	<b>143</b>	<b>153</b>

# Un enorme GRAZIE :

a tutti coloro che hanno sempre creduto in me, che hanno paragonato la mia tenacia e la mia trasparenza a quella di un diamante!!!

ai Prof. Daniele Fabbri, Prof. Alessandro Buscaroli,  
Dott. Denis Zannoni Dott. Giovanni Fontana e a “mia figlia” dal  
punto di vista professionale Dott.ssa Beatrice Fabbri perché essere  
rispettati, ascoltati e capiti è mooolto importante!!!  
Senza di Voi non avrei concluso il mio dottorato;

ai miei compagni di viaggio in questi SEI anni trascorsi al CIRSA ed  
in particolare agli studenti di Biologia marina (ormai tutti dottori!!!) che  
hanno illuminato il mio ultimo anno di dottorato: Federica Inzolia,  
Alessandro Bini, Elisa Fini, Gianluca Cirelli, Simona Masuccio e Laura  
Veerbek.

Cavolo raga anche io posso finalmente dire.....

BooOOooOOOoom Shakalaka!!!!!!!!!!

Ahhahahahaha

